

Caractérisation du mécanisme de reconnaissance des ARN et de la modulation de
l'activité catalytique de la RNase III de *Saccaromyces cerevisiae*, Rnt1p.

Par

Marc-André Comeau

Thèse présentée au département de biologie en vue de
l'obtention du grade de doctorat (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 22 août 2018

Le 22 août 2018

Le Jury a accepté la thèse de monsieur Marc-André Comeau dans sa version finale

Membres du jury

Professeur Daniel Lafontaine

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Sherif Abou Elela

Co-directeur de recherche

Département de microbiologie et infectiologie

Professeure Michelle Scott

Membre interne

Département de biochimie

Professeur Thomas Duchaine

Membre externe

Département de biochimie

Université McGill

Professeur Kamal Bouarab

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

La dégradation et la maturation de l'ARN sont des processus essentiels permettant de réguler l'expression des gènes et de former des complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans des fonctions cellulaires telles que l'épissage et la traduction. Les ribonucléases de type III (RNase III) sont des enzymes qui clivent l'ARN double-brin. En reconnaissant une telle structure, elles sont impliquées dans la maturation, le contrôle de qualité des ARN et dans les changements d'expression géniques en réponse aux stimuli environnementaux.

En utilisant la RNase III de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle d'étude nous avons entrepris de déterminer les mécanismes par lesquels cette enzyme sélectionne ses substrats, et d'élucider de quelle façon son activité enzymatique est régulée. Nos travaux sur la structure de Rnt1p complexé à un ARN ont révélé que celle-ci possède un nouveau motif de liaison à l'ARN qui reconnaît spécifiquement une guanine. Ce motif explique l'omniprésence des substrats de Rnt1p ayant une tétraboucle avec la séquence NGNN. Les expériences subséquentes sur la réactivité de divers substrats ont déterminé qu'une partie de ceux-ci ont leur réactivité qui est modulée par le produit de réaction. Certains produits de réaction se dissocient lentement de l'enzyme et cette affinité accrue a pour effet de diminuer le taux de roulement de l'enzyme. Ce mécanisme dépend d'un motif structural présent près du site de clivage. Ces travaux ajoutent de nouvelles connaissances sur la compréhension du mécanisme d'action des RNases III

Mot Clés : Rnt1p, Ribonucléase, RNase III, ARN double-brin, dégradation d'ARN, rétro-inhibition, déterminant enzymatique, structure cristalline.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Daniel Lafontaine et Sherif Abou Elela pour me permettre d'effectuer les travaux de cette thèse. Je veux remercier les membres de ces laboratoires qui m'ont permis de travailler avec une des équipes les plus talentueuses et intelligente que j'ai eu la chance de voir. Un remerciement plus spécifique à Mathieu Lavoie qui a été un mentor lors de mes premières années. J'aimerais remercier aussi nos collaborateurs du laboratoire de Jihu Xi pour leur expertise inégalée en cristallographie. Je tiens aussi à mentionner le travail effectué par feu Catherine Desrosiers dont le travail de purification de protéines a été d'une grande aide pour les travaux présentés dans cette thèse.

D'un côté personnel, je tiens à remercier ma copine Karine Champagne pour avoir patiemment attendu la fin de mes études et avoir fait preuve d'une immense compréhension à mon égard. Je tiens à souligner le support de ma famille et mes amis qui ont su enjoliver mes moments en dehors du travail ont aussi eu une importance capitale dans le succès de cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iv
Remerciements	v
Table des matières	vi
Liste des abréviations	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Chapitre 1 : Introduction	1
1. L'expression des gènes est un processus régulé dans lequel l'ARN joue un rôle central	1
2. Les ARN naissants subissent plusieurs étapes de modification et d'assemblage afin d'obtenir un transcrit mature	3
2.1 La maturation des ARN non codants	3
2.1.1 La maturation des ARN ribosomiques	3
2.1.2 La maturation des petits ARN nucléolaires	6
2.1.3 La maturation d'ARNnc contenu à l'intérieur de transcrits primaires d'ARNm	6
2.2 La maturation des ARN messagers	8
3 Les mécanismes de dégradation des ARN	12
3.1 La dégradation générale des ARNm suite à la traduction permet le renouvellement des transcrits au cytoplasme	12
3.2 La présence d'un site de dégradation sur certains gènes permet un changement rapide du niveau d'ARNm	13
3.3 Les miARN régulent la traduction et la dégradation de plusieurs transcrits	15
3.4 Les mécanismes de contrôle de qualité assurent la dégradation des transcrits anormaux	17
3.4.1 Défaut au niveau de l'initiation ou l'arrêt de transcription	17

3.4.2	Défaut au niveau de la coiffe ou la queue poly-A	18
3.4.3	Défaut au niveau de l'épissage	18
3.4.4	Le contrôle de qualité lié à la traduction	19
3.4.5	Le contrôle de qualité des ARNnc	21
4	Les RNases III sont une famille d'enzyme conservée qui sont caractérisé par un domaine RIIID	22
4.1	L'architecture protéique des RNases III permet une liaison indépendante de la catalyse	24
5	Rnt1p, la ribonucléase de type III de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	26
5.1	<i>Saccaromyces cerevisiae</i> comme modèle d'étude du métabolisme de l'ARN	26
5.2	Rnt1p reconnaît spécifiquement les tétraboucles NGNN et AAGU	28
5.3	La liaison et l'activité catalytique de Rnt1p sont influencées par deux régions distinctes sur l'ARN	29
6	Objectifs du projet	30
	Chapitre 2	32
	La structure de Rnt1p lié à un ARN révèle les mécanismes de sélection des substrats et de détermination des sites de clivages	32
	Chapitre 3	86
	La réactivité des substrats de Rnt1p est encodée dans la structure du produit de réaction	86
	Chapitre 4 : Discussion	124
1	La structure cristalline de Rnt1p révèle un nouveau motif de liaison	124
2	Rnt1p reconnaît la séquence des boucles	126
3	Rnt1p contacte l'ARN sur trois régions	128
4	Une même famille, deux modes de reconnaissance des ARN	130
5	Le clivage par les RNases III est plus efficace que précédemment rapporté	133

6 Les ARN clivés par Rnt1p possédant le motif inhibiteur sont davantage présents dans les ARNm	134
7 Les RNases III subissent deux changements de conformation lors du clivage de l'ARNdb	136
8 Le modèle par étapes du mécanisme de Rnt1p	138
9 Le comportement inhibiteur du produit de l'ARN de MIG2 et de U5 nous renseigne sur le mécanisme de Rnt1p.	139
Conclusions et perspectives	142
Le motif inhibiteur et le mécanisme des RNases III	142
La reconnaissance d'autres substrats	144
Les modifications post-traductionnelles	145
Annexe 1	147
Bibliographie	148

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ARN : Acide Ribonucléique

ARNdb : ARN double-brin

ARNm : ARN messenger

ARNn: petit ARN nucléaire

ARNnc : ARN non-codant

ARNno: petit ARN nucléolaire

ARNr: ARN ribosomique

ARNt: ARN de transfert

dsRBD : Domaine de liaison à l'ARN double-brin

ETS : Région d'espacement externe

ITS : Région d'espacement interne

miARN: micro-ARN

Mig2-PR : produit de réaction de la tige boucle clivée par Rnt1p pour l'ARN du gène MIG2.

NMD : Dégradation médiée par codon non-sens

NTD : domaine N-terminal

NSD : Dégradation médiée par sans arrêt

RBM : motif de liaison à l'ARN

RIIID : Domaine RNase III

RMN : résonance magnétique nucléaire

RNase: Ribonucléase

RNase III: Ribonucléase de type III

U5-PR : produit de réaction de la tige boucle clivée par Rnt1p pour l'ARN du gène U5

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1	Rôles de Rnt1p dans le métabolisme de l'ARN.	27
-----------	--	----

CHAPITRE 2

Table 1	Data Collection and Structure Refinement Statistics	41
---------	---	----

Table S1	Kinetic and Binding Parameters of Rnt1p Proteins on the G2 Substrates, Related to Figures 4, 5, and 6.	79
----------	--	----

Table S2	List of Oligonucleotides Used For PCR-directed Mutagenesis of Rnt1p, Related to Figures 3, 4, 5, and 6	80
----------	--	----

CHAPITRE 3

Supplementary Table 1	Compilation of kinetic parameters calculated for the fluorescent substrate in this study.	118
-----------------------	---	-----

ANNEXE 1

Tableau 2	Affinité d'un ARN long de type AAGU.	147
-----------	--------------------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1	Modèle de maturation post-transcriptionnelle des ARN ribosomiques.	5
Figure 2	Maturation des miARN et des ARNno	8
Figure 3	Maturation et dégradation générales des ARNm.	11
Figure 4	Des éléments de dégradation spécifique à certains ARNm permettent une régulation rapide de l'expression génique lors d'un changement des conditions environnementales.	14
Figure 5	Maturation et mécanisme d'interférence des miARN	16
Figure 6	Mécanismes de contrôle de qualité des ARN.	20
Figure 7	Les RNases III sont une famille d'enzyme qui reconnaît l'ARNdb.	23
Figure 8	L'activité de Rnt1p dépend de deux régions sur l'ARN.	27

CHAPITRE 2

Figure 1	New Mode of Substrate Recognition by RNase III	40
Figure 2	Cleavage Site Assembly of Eukaryotic RNase III 2	44
Figure 3	New RNA-Binding Motif, RBM0, Identifies the NGNN Tetraloop	46
Figure 4	G-clamp Is Tailored for the Recognition of Gua16	51
Figure 5	dsRBD Interacts with the Stem down to the 9th Base Pair below the Tetraloop	54
Figure 6	NTD Dimer Interacts with RNA to Increase Binding Affinity and the Precision of Cleavage Site Selection	57
Figure 7	Double-Ruler Mechanism for Substrate Selection by Rnt1p	64
Figure S1	Composition and Quality of RNA and Protein Molecules Used in This Study, Related to Figure 1	74
Figure S2	Sequence and Structure of RNase III, Related to Figure 2	75

Figure S3	Structural Details of Rnt1p-Tetraloop Interactions and Impact of the Q373A Mutation on Substrate Cleavage, Related to Figure 3	76
Figure S4	Recognition of the AGUC, AGAA, or AAGU Tetraloop by ScRnt1p, Related to Figure 4	77
Figure S5	Distinct Positions of the NTD Dimer in Relation to the RIIID Dimer in KpDcr1 and ScRnt1p, Related to Figure 6	78
CHAPITRE 4		
Figure 1	Continuous fluorescence assay of Rnt1p cleavage reveals rapid pre-steady state kinetics.	96
Figure 2	The steady state kinetics of Rnt1p is defined by sustained product inhibition.	100
Figure 3	Product inhibition dictates the reactivity of natural mRNA degradation signals.	101
Figure 4	Product release step determined the reactivity of Rnt1p substrates.	104
Figure 5	Identification of reactivity determinants near Rnt1p cleavage site.	107
Figure 6	Rnt1p reactivity is modulated by the number of base-pairs upstream of the cleavage site.	108
Figure 7	Pairing near the cleavage efficiency box modifies the rate of Rnt1p cleavage.	110
Figure S1	Validation of Rnt1p fluorescence cleavage assay.	116
Figure S2	The cleavage products inhibit Rnt1p turnover in monovalent salt sensitive manner	117
CHAPITRE 4		
Figure 9	Le domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p possède deux hélices alpha supplémentaires lui permettant de lier la guanine des tétraboucles de type G2.	125

Figure 10	Interactions entre Rnt1p et l'ARN	129
Figure 11	Deux modes de reconnaissance des ARNdb par les RNases III.	132
Figure 12	Données adaptées de (Gagnon et al, 2016) : Identification d'ARN possédant le motif inhibiteur	136
Figure 13	Adaptée de (Song et al 2017) : Le cycle fonctionnel de Rnt1p.	139
Figure 14	Mécanisme d'action de Rnt1p	141
Figure 15	Conservation des motifs de liaison à l'ARN	143
Figure 16	Motif putatif de liaison à l'adénine	145

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. L'expression des gènes est un processus régulé dans lequel l'ARN joue un rôle central

L'expression génique est le processus par lequel l'information contenue dans le génome est utilisée afin de produire une biomolécule fonctionnelle (Lodish et al., 2004). Le matériel génétique présent dans les cellules d'un être vivant contient l'ensemble de l'information nécessaire à son cycle de vie et à son adaptation. Tous les gènes ne sont pas exprimés en même temps et leurs expressions varient selon, par exemple, les nutriments disponibles et le cycle cellulaire. Soumises à différents stress, les cellules doivent aussi constamment s'adapter en modifiant l'expression de leurs gènes afin de surmonter les changements environnementaux qu'elles subissent (López-maury et al., 2008). Pour les organismes pluricellulaires, la majorité des cellules possèdent la même information génétique et c'est en coordonnant l'expression d'un sous-ensemble de gènes spécifiques à chaque tissu que l'organisme se développe normalement (O'Connor, C. M. & Adams, 2010). Ainsi, les gènes sont exprimés de façon spatio-temporelle ou en fonction des besoins physiologiques de la cellule.

La théorie fondamentale de la biologie moléculaire stipule que l'ADN contient l'information génétique et qu'il est répliqué lors de la division cellulaire afin de transmettre cette information aux cellules filles. Lorsqu'un gène est exprimé, l'ADN est transcrit en ARN messagers (ARNm), ces derniers sont traduits en protéines qui vont par la suite effectuer une fonction structurale, enzymatique ou de communication au sein de la cellule (Crick, 1970). Dans ce schéma, l'ARNm est un intermédiaire

important puisque sa traduction permet la synthèse de protéines. Ainsi, lorsqu'une protéine n'est plus nécessaire, les cellules dégradent l'ARNm et peuvent arrêter la transcription afin de l'éliminer. À l'opposé, une augmentation de la transcription ou la stabilisation d'ARNm permet d'augmenter leur niveau. L'expression des gènes codant pour des protéines est donc le résultat d'une dynamique entre la production et la dégradation des ARNm. Bien que plusieurs études aient par le passé étudié la régulation de l'initiation de transcription en tant que régulateur de l'expression génique (Hahn and Young, 2011), de plus en plus d'évidences démontrent que la dégradation de l'ARNm est un élément majeur de l'expression génétique, comme dans le cas du métabolisme des sucres (Ge et al., 2005; Lavoie et al., 2011), du stress osmotique (Catala et al., 2012; Romero-santacreu et al., 2009), de l'adaptation au changement de températures (Beran and Simons, 2001; Yamanaka and Inouye, 2001) ou encore de la progression du cycle cellulaire (Cai et al., 2002; Gill et al., 2004). Par ailleurs, de nombreux gènes ne codent pas pour des protéines et sont transcrits en ARN non-codants (ARNnc). Dans ce cas, l'ARN est la biomolécule fonctionnelle et n'est pas seulement qu'un intermédiaire. Les classes majeures d'ARNnc comprennent les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les petits ARN nucléolaires (ARNno), les petits ARN nucléaires (ARNn) et les microARN (miARN) (Lodish et al., 2004). Ces ARN sont essentiels pour effectuer des processus comme la traduction, l'épissage (Mount et al., 1983), la biogenèse des ribosomes (Henras et al., 2015) et ils participent aussi à la régulation (Reinhart et al., 2000) et à la maturation d'autres ARN (Kass et al., 1990). Il est donc important de bien comprendre le cycle de vie des ARN : de leur transcription et leur maturation jusqu'à leur dégradation afin de bien cerner les facteurs qui influencent l'expression génique.

2. Les ARN naissants subissent plusieurs étapes de modification et d'assemblage afin d'obtenir un transcrit mature

Chez les eucaryotes, on dénote trois polymérases d'ARN qui vont chacune transcrire une classe de gènes spécifiques (Lodish et al., 2004). La polymérase I est responsable de la transcription d'un transcrit polycistronique contenant les ARNr 18S, 25S/28S et 5.8S. En raison de l'abondance et de l'importance des ribosomes dans les cellules, environ 50% de la transcription totale proviendrait uniquement de ce transcrit pour des cellules en phase de croissance (Warner, 1999). La polymérase III est responsable de la transcription de l'ARNr 5S, des ARNt ainsi que d'autres ARNnc tel que certains miARN et ARNn. La polymérase II transcrit une grande variété de gènes, dont tous les ARNm. Les transcrits primaires en provenance des polymérases subissent ensuite de multiples étapes de maturation et de remodelage qui sont propres à chaque classe d'ARN.

2.1 La maturation des ARN non codants

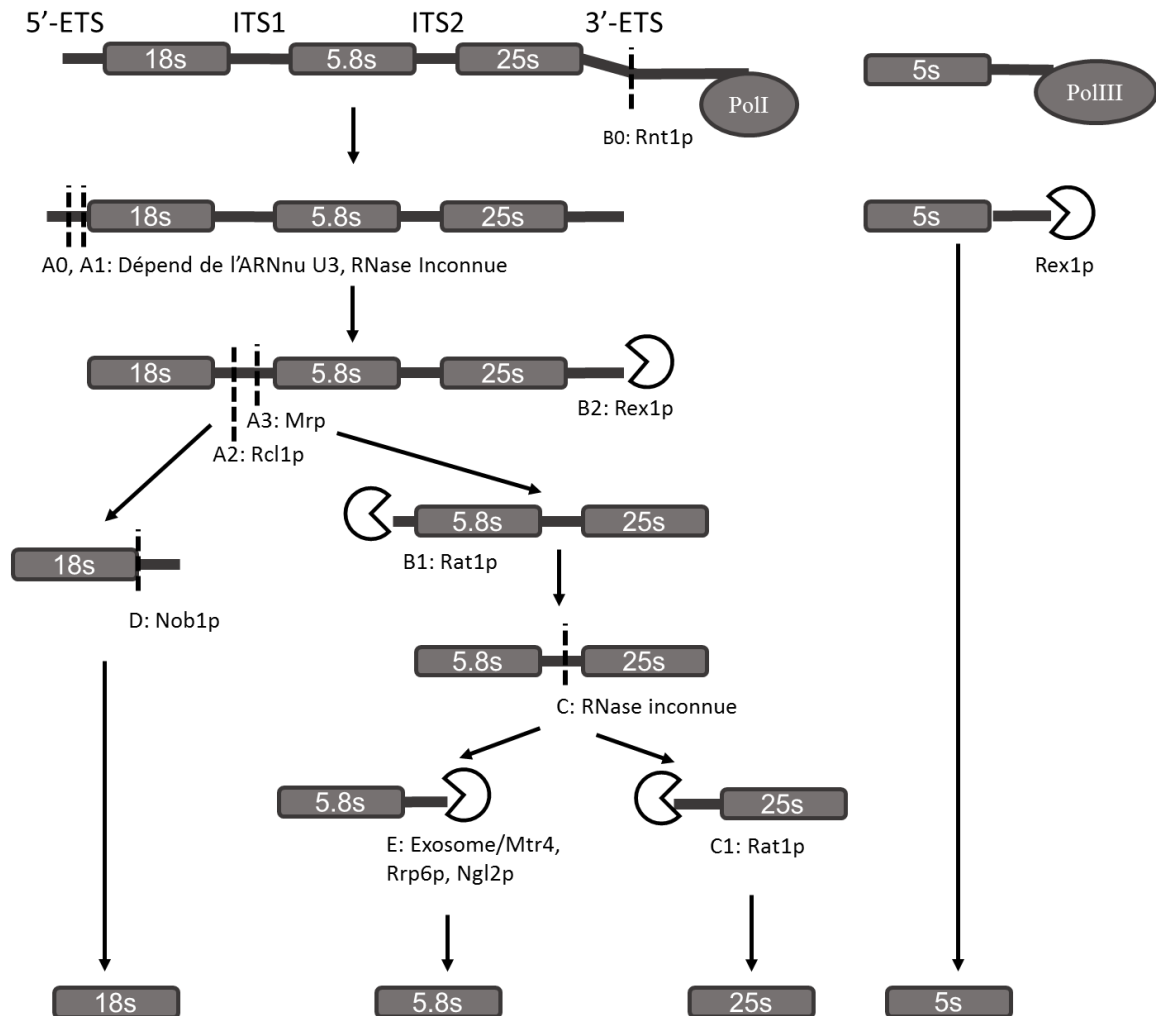
Les ARNnc sont souvent transcrits sous forme de précurseurs ayant des extensions et des régions d'espacement. Plusieurs étapes sont nécessaires afin d'obtenir la forme finale de l'ARN. Cette section survole les maturations des grandes classes d'ARNnc en mettant l'emphasis sur les ribonucléases (RNase) impliquées dans ce processus.

2.1.1 La maturation des ARN ribosomiques

1 Les mécanismes d'assemblage et de maturation des ribosomes ont été étudiés de
2 manière exhaustive chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez cet organisme,
3 les ribosomes sont assemblés à partir de 79 protéines ribosomiques et de 4 ARNr
4 nommés 25S, 18S, 5.8S et 5S. L'ARN du ribosome a une fonction cruciale, car il est
5 non seulement la charpente sur laquelle les protéines se lient, mais il est aussi porteur
6 de l'activité catalytique (Nissen, 2000). Les transcrits primaires d'ARN subissent une
7 série de clivages précis et efficaces afin de synthétiser près de 2000 ribosomes
8 chaque minute lors de la croissance exponentielle (Warner, 1999). À l'intérieur du
9 transcrit primaire polycistronique, les ARNr 18S, 5.8S et 25S sont séparés par les
10 régions d'espacements internes 1 et 2 (ITS1/2) et flanqués par des régions externes
11 en 5' et 3' (5'-ETS, 3'-ETS). Premièrement, la maturation du 3'-ETS est initiée par la
12 coupure au site B0 par l'endoribonucléase Rnt1p afin de relâcher le transcrit de la
13 polymérase (Elela et al., 1996) et le 5'-ETS est mûré par un complexe lié à l'ARNno
14 U3 pour effectuer deux clivages aux sites A0 et A1 (Dragon et al., 2002). Rex1p
15 effectue un élagage 3'-5' de l'ARN afin de terminer la maturation du 3'-ETS au site B2
16 (van Hoof et al., 2000a). L'ITS1 est clivé à la fois par Rcl1p au site A2 (Billy et al.,
17 2000) et par le complexe ribonucléoprotéique Mrp au site A3 (Chu et al., 1994) afin
18 de libérer le transcrit 18S. Celui-ci sera exporté au cytoplasme et sa maturation sera
19 achevée par un clivage au site D par Nob1p (Lamanna and Karbstein, 2009). Le
20 transcrit contenant l'ARNr 5.8S et l'ARNr 25S est soumis à un élagage 5'-3' par Rat1p
21 afin d'éliminer la région résiduelle de l'ITS1. L'ITS2 est par la suite clivé en deux
22 parties pour séparer l'ARNr 5.8S et l'ARNr 25S. La RNase impliquée dans cette étape
23 n'a pas encore été identifiée (Henras et al., 2015). L'ARN 5.8S est mûré par un
24 élagage 3'-5' effectuée par l'exosome (Mitchell and Tollervey, 1996), Mtr4p et l'action
25 de Rrp6p (Briggs et al., 1998). Il est par la suite exporté au cytoplasme et l'action de
26 Ng12p mène à l'obtention de l'ARN 5.8S mature (Faber et al., 2002). L'ITS2 présent
27 en 5' de l'ARNr 25S est dégradé par Rat1p et l'ARN mature est exporté au cytoplasme
28 (Geerlings et al., 2000). L'ARNr 5S quant à lui est synthétisé par la polymérase III et
29 son transcrit primaire ne subit qu'une étape de récession 3'-5' par la protéine Rex1p

(van Hoof et al., 2000a). La formation de la structure stable de l'ARNr 5S arrête Rex1p et le transcrit mature est obtenu (Fernández-Pevida et al., 2015). La figure 1 résume les étapes de maturation des ARNr.

4



5

Figure 1 : Modèle de maturation post-transcriptionnelle des ARN ribosomiques.

Le schéma résume les différentes étapes de clivage et d'élagage que les transcrits primaires d'ARNr subissent. Les coupures endonucléolytiques sont indiquées par des traits pointillés et les élagages effectués par des exonucléases par un cercle partiel. Les sites de maturations sont identifiés selon la nomenclature établie pour *S.cerevisiae* et les protéines impliquées connues sont indiquées. Adapté de (Fernández-Pevida et al., 2015; Henras et al., 2015).

12

2.1.2 La maturation des petits ARN nucléolaires

Les ARNno sont de petits ARNs qui ont comme rôle de guider les modifications sur l'ARNr. Ils sont divisés en deux classes : les boîte C/D, qui guident les méthylations et les H/ACA qui guident les pseudouridylations. Chez *S.cerevisiae* le groupe d'ARNno de type C/D snR72-78 est transcrit d'un promoteur commun pour générer un transcrit primaire polycistronique. Celui-ci est subséquemment mûré par la RNase III de *S.cerevisiae*, Rnt1p qui clive dans la région en 5' et dans chaque espacement entre les ARNno (Figure 2). Ces ARN sont par la suite mûrés par Rat1p pour obtenir l'ARN mature (Qu et al., 1999). L'arrangement d'ARNno en groupe a aussi été observé chez les eucaryotes supérieurs lorsque ceux-ci ont leur propre promoteur (Liang et al., 2002; Nahkuri et al., 2008; Qu et al., 2001).

2.1.3 La maturation d'ARNnc contenu à l'intérieur de transcrits primaires d'ARNm

Chez les métazoaires, les miARN sont de petits ARN interférents qui influencent la dégradation, la traduction et la transcription des gènes. Il est proposé qu'environ 90% des gènes humains seraient potentiellement régulés par leur action (Perron and Provost, 2008). Bien que plusieurs miARN soient présents en locus autonomes, environ 50% des miARN sont encodés à l'intérieur d'introns d'ARNm et doivent être excisés du transcrit hôte de manière indépendante de l'épissage (Morlando et al., 2008). Cette maturation s'effectue par le recrutement du complexe Drosha/DGCR8 au promoteur par une interaction avec la polymérase II. Au cours de l'élongation de l'ARNm hôte, DGCR8 va lier la structure double-brin du miARN et Drosha va effectuer un clivage co-transcriptionnel qui précède l'épissage afin de libérer le précurseur du miARN (Morlando et al., 2008). De cette façon, le miARN est co-exprimé avec le gène

1 hôte (Baskerville and Bartel, 2005) ou l'expression du miARN est régulé
2 indépendamment, soit par recrutement du complexe Drosha\DGCR8 ou par la
3 compétition avec certains facteurs d'épissage (Agranat-Tamir et al., 2014; Finnegan
4 and Pasquinelli, 2013).

5

6 La maturation des ARNno est aussi effectuée majoritairement à partir d'introns chez
7 l'humain (Hirose and Steitz, 2001). Dans ce cas, au lieu d'exciser le petit ARN de
8 l'intron à l'aide d'une RNase, les protéines liant les ARNno vont se lier sur le transcrit
9 primaire (Ballarino et al., 2005) (Nop58/15.5kDa/Fib pour les ARNno de type C/D,
10 Nhp2/Dys/Nop10 pour les types H/ACA). Suite à l'épissage et au débranchement de
11 l'intron, celui-ci est dégradé par les exoribonucléases nucléaires qui sont arrêtées au
12 niveau de l'ARNno par les protéines associées. La maturation des ARNno encodés
13 dans les introns est donc effectuée de manière concomitante à l'épissage (Hirose and
14 Steitz, 2001).

15

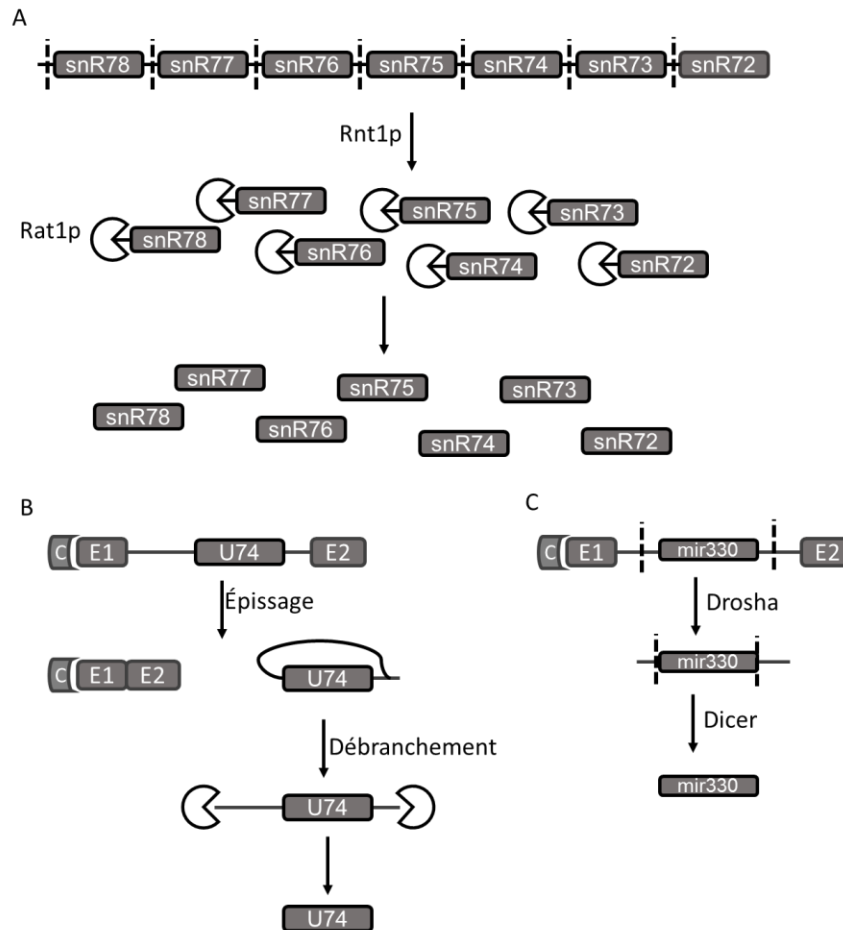


Figure 2 : Maturation des miARN et des ARNno

A) Maturation d'ARNnc transcrits en groupe. Le cas du transcrit snR72-78 est présenté B) Maturation d'un ARNnc (U74) qui est couplée à l'épissage C) L'ARNnc mir330 est intronique et mûré indépendamment de l'épissage. Dans chaque cas, les RNases identifiées pour la maturation sont indiquées. Les clivages endonucléolytiques sont représentés par des pointillés et les étapes d'élagages par des cercles partiels.

2.2 La maturation des ARNm

La maturation des ARNm comprend trois étapes majeures : la maturation de l'extrémité 5', l'épissage et la maturation de l'extrémité 3'. Tout d'abord lors de

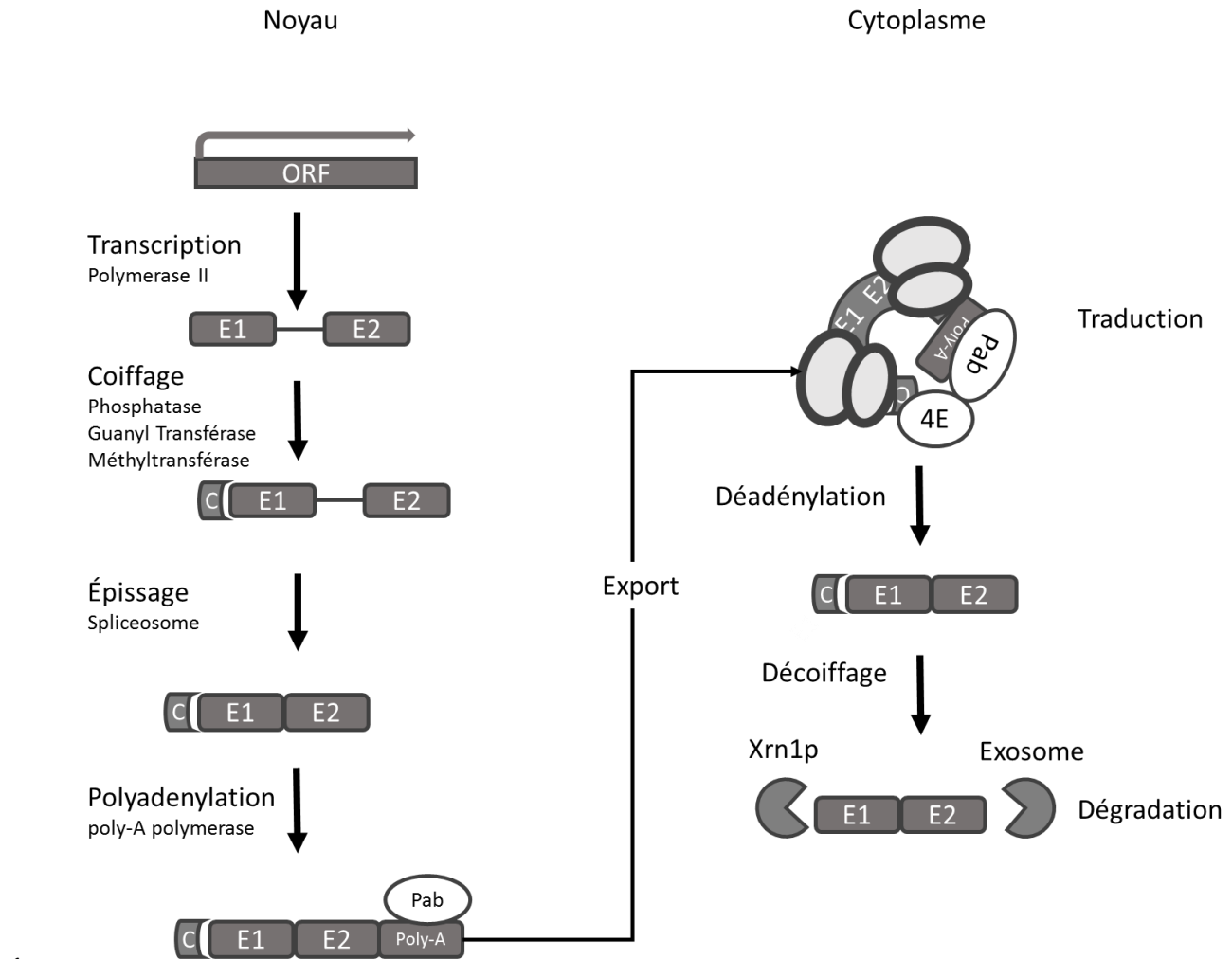
1 l'élongation du transcrit primaire par la polymérase II, l'extrémité 5' sera rapidement
2 coiffée par un résidu 7-méthylguanine. Cette modification est effectuée par l'action
3 successive de trois enzymes : une phosphatase qui change le 5'-ATP en 5'-ADP, une
4 guanyl transférase qui attache une molécule de GMP en conformation 5'-5' et une
5 méthyltransférase qui méthyle la position 7 de la guanine (Ghosh and Lima, 2010).
6 Cette coiffe stabilise le 5' de l'ARN en le protégeant de l'action d'exoribonucléases 5'-
7 3' et est reconnue par des protéines liant la coiffe. Au noyau, cette coiffe est liée et
8 stabilisée par les protéines Cbc1p/Cbc2p (Izaurralde et al., 1994).

9

10 Par la suite, les transcrits primaires peuvent aussi posséder un ou plusieurs introns
11 qui doivent être excisés (Berget et al., 1977). La proportion des gènes possédant des
12 introns augmente avec la complexité de l'espèce passant d'environ 5% chez la levure
13 *S.cerevisiae* à plus de 95 % chez les mammifères (Lander et al., 2001; Maniatis and
14 Tasic, 2002; Venter et al., 2001). Les introns peuvent exercer des fonctions
15 régulatrices sur l'expression de leur gènes hôtes (Parenteau et al., 2011), participer à
16 la diversité des protéines produites suite à l'épissage alternatif (Matlin et al., 2005;
17 Nilsen and Graveley, 2010; Rosenfeld et al., 1982) ou encoder pour des ARNnc
18 (Baskerville and Bartel, 2005; Liu and Maxwell, 1990; Sollner-Webb, 1993).
19 L'épissage est effectué par le spliceosome qui est un complexe ribonucléoprotéique
20 composé de 5 ARNn (U1, U2, U4, U5, U6), d'un assemblage de 105 protéines cœur
21 ainsi que de plusieurs protéines périphériques dont la présence varie au cours du
22 processus d'épissage (Bessonov et al., 2008). Au total environ 150 protéines sont
23 impliquées dans la fonction du spliceosome ce qui en fait une des machineries
24 cellulaires les plus complexes à être caractérisée. (Lodish et al., 2004). La jonction
25 entre le premier exon et l'intron est d'abord reconnue par le complexe U1 (Mount et
26 al., 1983) et le site de branchement par le complexe U2 (Black et al., 1985). Le
27 complexe U4/U5/U6 reconnaît par la suite la jonction entre l'intron et le deuxième exon
28 (Chabot et al., 1985) et interagit avec U2 pour rapprocher les deux exons afin d'exciser
29 l'intron (Wu and Manley, 1991).

1 Pour terminer, le transcrit primaire est aussi mûri en sa partie 3' par l'ajout d'une
2 queue poly-A (Lim L, 1970). Cet événement est couplé à la terminaison de la
3 transcription. Lors de la transcription, le site de polyadénylation (habituellement
4 AAUAAA) (Proudfoot, 1989) est reconnu par le complexe CPSF qui recrute les
5 facteurs de clivage (Cf1p/Cf2p) sur l'ARN (Birse et al., 1998; Manley, 1995). Cette
6 coupure fait décrocher la polymérase et une poly-A polymérase ajoute la queue
7 d'adénine au transcrit. Cette partie de l'ARNm est par la suite liée par la protéine liant
8 le poly-A (Pab1p) (Proudfoot, 2011). Cette liaison masque la partie 3' de l'ARN le
9 protégeant de la dégradation par les exoribonucléases. Plusieurs facteurs d'export
10 (complexe TREX) sont aussi déposés sur l'ARN au cours de la transcription (Strässer
11 et al., 2002). Ceux-ci participent à l'export de l'ARNm au travers du pore nucléaire.
12 Chez les mammifères, une étape de traduction dite « pionnière » est couplée à
13 l'arrivée des ARNm au cytoplasme par le pore nucléaire (Ishigaki et al., 2001). Le
14 ribosome effectue alors un cycle de traduction afin de détecter des défauts dans
15 l'ARNm et déclencher sa dégradation si nécessaire (les mécanismes de contrôle de
16 qualité de l'ARN sont discutés en détail plus loin dans ce chapitre). Suite à cette étape,
17 les protéines liant la coiffe sont interchangeables par les facteurs d'initiation de la
18 traduction eIF4E/eIF4G. Ceux-ci interagissent avec la protéine Pab1p et le ribosome,
19 l'ARNm est circularisé et devient actif pour être traduit par les ribosomes (Lodish et
20 al., 2004; Sachs and Davis, 1989). Les étapes de maturation des ARNm sont
21 résumées dans la figure 3.

22



1

2 **Figure 3 : Maturation et dégradation générales des ARNm.**

3 Le gène (ORF) est transcrit an ARN primaire contenant 2 exons (E1, E2) ainsi qu'un intron
 4 (ligne uniforme). Le transcrit est mûré par l'ajout d'une coiffe 7 méthylguanine (C) qui
 5 stabilise le 5' de l'ARN. Le spliceosome excise l'intron lors de l'épissage et la protéine CPSF
 6 ajoute la queue poly-A qui est stabilisée par plusieurs protéines Pab1p (Pab). Suite à l'export,
 7 le facteur eiF4E/eiF4G (4E) est lié à l'ARN, interagit avec Pab1p pour circulariser l'ARNm qui
 8 sera traduit. La déadénylation et le décoiffage rendent par la suite le transcrit accessible à la
 9 dégradation par Xrn1p et l'exosome.

10

11

3. Les mécanismes de dégradation des ARN

Comme mentionné précédemment, la dégradation des ARN est un processus essentiel qui permet de varier dynamiquement l'expression des gènes afin d'adapter les cellules aux conditions environnementales changeantes. Ce processus permet aussi de s'assurer de la destruction des ARN anormaux et non fonctionnels. Cette section traite tout d'abord du mécanisme de dégradation de l'ARNm et par la suite des mécanismes de contrôle de qualité qui assurent la dégradation d'ARN dont la maturation est déficiente.

3.1 La dégradation générale des ARNm suite à la traduction permet le renouvellement des transcrits au cytoplasme.

Comme il a été mentionné à la section 2.2, les ARNm correctement maturés sont stables et exportés au cytoplasme afin d'être traduits. Suite à la traduction, la queue poly-A de l'ARNm est raccourcie par un complexe de déadénylation (Ccr4p-Notp-Prp2p ou Pan2p) qui est recruté par un facteur lié à la terminaison de la traduction (eRF3) (Decker and Parker, 1993). Chaque ronde de traduction réduit ainsi graduellement la longueur de la queue poly-A et déstabilise l'interaction avec Pab1p (Parker, 2012). Le recrutement du complexe de décoiffage (DCP1/2) enlève ensuite la coiffe en 5' de l'ARNm et le transcrit est dégradé par Xrn1p en direction 5'-3' (Muhlrad et al., 1994) et l'exosome en direction 3'-5' (Anderson and Parker, 1998). Bien que les deux modes de dégradation soient présents, la dégradation 5'-3' par Xrn1p semble être la voie majeure de dégradation des ARNm. En effet, les mutations de facteurs de décoiffage ont un effet beaucoup plus important sur la croissance que les mutations de facteurs impliqués dans la dégradation cytoplasmique 3'-5' (Anderson and Parker, 1998; Beelman et al., 1996). Cette voie de dégradation

générale des ARNm, résumée dans la figure 3, assure le renouvellement des transcrits au cytoplasme et permet d'établir le nombre de cycles de traduction qui sera effectué sur chaque ARN.

3.2 La présence d'un site de dégradation sur certains gènes permet un changement rapide du niveau d'ARNm.

Une stratégie employée par les cellules pour réguler la stabilité de certains ARNm est d'ajouter un élément à l'ARN qui est reconnu par une RNase afin d'initier sa dégradation. Par exemple, le gène *PNP* code pour une exoribonucléase considérée essentielle pour la croissance de la bactérie *E.coli* à basse température (Zangrossi et al., 2000) et qui est surexprimée environ 10 fois suite à un choc frigorifique (Beran and Simons, 2001). En condition de croissance normale, l'ARN de PNP est clivé dans sa partie 5'-initiale par une endoribonucléase de type III (RNase III) afin de diminuer son expression (Régnier and Portier, 1986). Suite à un passage à basse température, la bactérie synthétise la protéine YmdB qui va se lier au site catalytique de la RNase III et ainsi inhiber le clivage de l'ARN par cette enzyme (Kim et al., 2008). L'ARNm s'en trouve stabilisé et le niveau de Pnpase est augmenté afin de permettre la régulation série de gènes impliqué dans l'adaptation aux basses températures (Beran and Simons, 2001). Un second exemple de l'utilisation de cette stratégie est le cas de la protéine Mig2p chez *S.cerevisiae*. Mig2p est un répresseur de transcription de gènes impliqués dans des voies métaboliques des sucres complexes en réprimant *SUC2*, qui est le gène de l'enzyme hydrolysant le sucrose (un disaccharide) (Lutfiyya et al., 1998). Dans une condition où le glucose est présent, l'ARNm de *MIG2* est transcrit activement, mais est aussi dégradé par la RNase III de la levure, Rnt1p. Cette enzyme dégrade seulement une fraction de la population des ARNm de *MIG2* et les transcrits intacts sont traduits pour produire la protéine (Ge et al., 2005). Lors d'une carence en glucose la transcription est réprimée, la dégradation de l'ARNm prédomine

sur sa production et l'expression de *MIG2* est éteinte (Lavoie et al., 2011). L'ajout d'un élément ciblant la dégradation de cet ARNm permet d'arrêter la production de Mig2p ainsi la cellule adapte promptement son métabolisme pour utiliser d'autres sources de sucres. La figure 4 résume ces mécanismes d'activation ou de répression de gènes possédant un élément de dégradation spécifique.

L'ajout d'un élément ciblant la dégradation d'un ARN peut donc servir d'interrupteur pour activer ou réprimer un gène dans une condition précise. En agissant de la sorte, la régulation de l'expression du gène serait plus rapide que pour les gènes seulement régulés au niveau de leur promoteur (Lavoie et al., 2011; Pérez-Ortín et al., 2007).

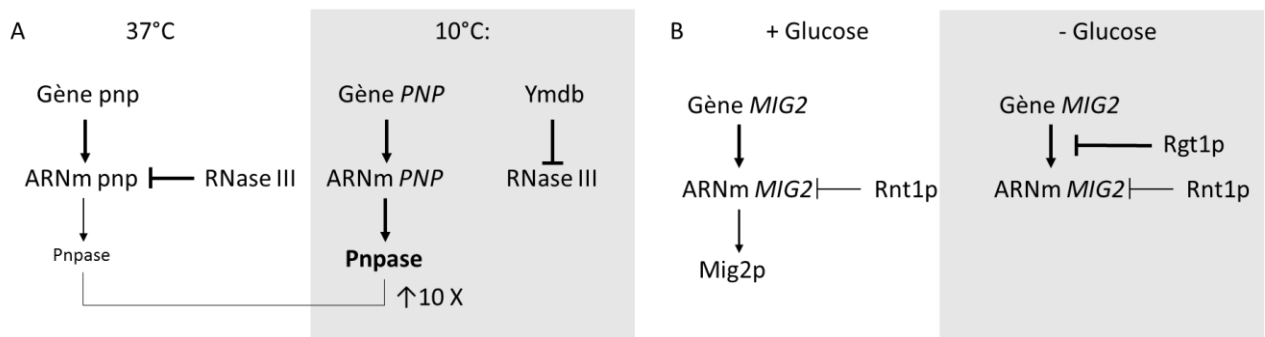


Figure 4 : Des éléments de dégradation spécifique à certains ARNm permettent une régulation rapide de l'expression génique lors d'un changement des conditions environnementales.

A) L'inhibition de la dégradation de l'ARNm de la Pnpase lors d'un choc frigorifique augmente son expression. B) La dégradation constante de l'ARNm de *MIG2* permet de réprimer rapidement son expression suite à l'arrêt de la transcription.

3.3 Les miARN régulent la traduction et la dégradation de plusieurs transcrits

Les microARN sont de petits ARN régulant des transcrits endogènes qui ont été découverts suite à l'étude des gènes *let-7* et *lin-4* chez l'organisme *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Leur maturation demande deux étapes de clivage et un chargement de l'ARN dans une protéine argonaute (Figure 5A). Le transcrit primaire des miARN (pri-miARN) est tout d'abord clivé par le complexe microprocesseur afin de générer le pré-miARN (Lee et al., 2003). Le complexe microprocesseur est composé de Drosha, une RNase III qui effectue le clivage, et de DGCR8, une protéine liant l'ARN qui stabilise l'interaction avec le pri-miARN. Le pré-miARN est par la suite exporté au cytoplasme via l'exportine 5 (Obernosterer et al., 2006). Au cytoplasme, il est à nouveau clivé par une RNase III, Dicer (Bernstein et al., 2001) et l'ARN double-brin est déroulé et le brin guide est chargé dans une protéine argonaute pour former le complexe RISC (RNA induced silencing complex) (Gregory et al., 2005). Le complexe RISC interagit ensuite avec la protéine GW182. Ce complexe utilise une région sur l'ARN appelée « seed » afin de reconnaître les ARNm ciblés en liant le 3' UTR de ces ARNm par complémentarité. Cette interaction provoque l'inhibition de la traduction du messenger. Cette interaction peut aussi provoquer la dégradation du transcrit en recrutant tout d'abord des facteurs de déadénylation (CCR4-NOT et PAN2/3) et des facteurs de décoiffement de l'ARN (DCP1/2). L'ARNm déprotégé est ensuite dégradé par les voies de dégradation majeures 5'-3' (XRN1) et 3'-5' (exosome) (Figure 5B). Dans certain cas, la protéine GW182 peut aussi déstabiliser l'ARN en déplaçant les protéines liant la queue poly-A du messenger et ainsi le rendre accessible aux exonucléases 3'-5'.

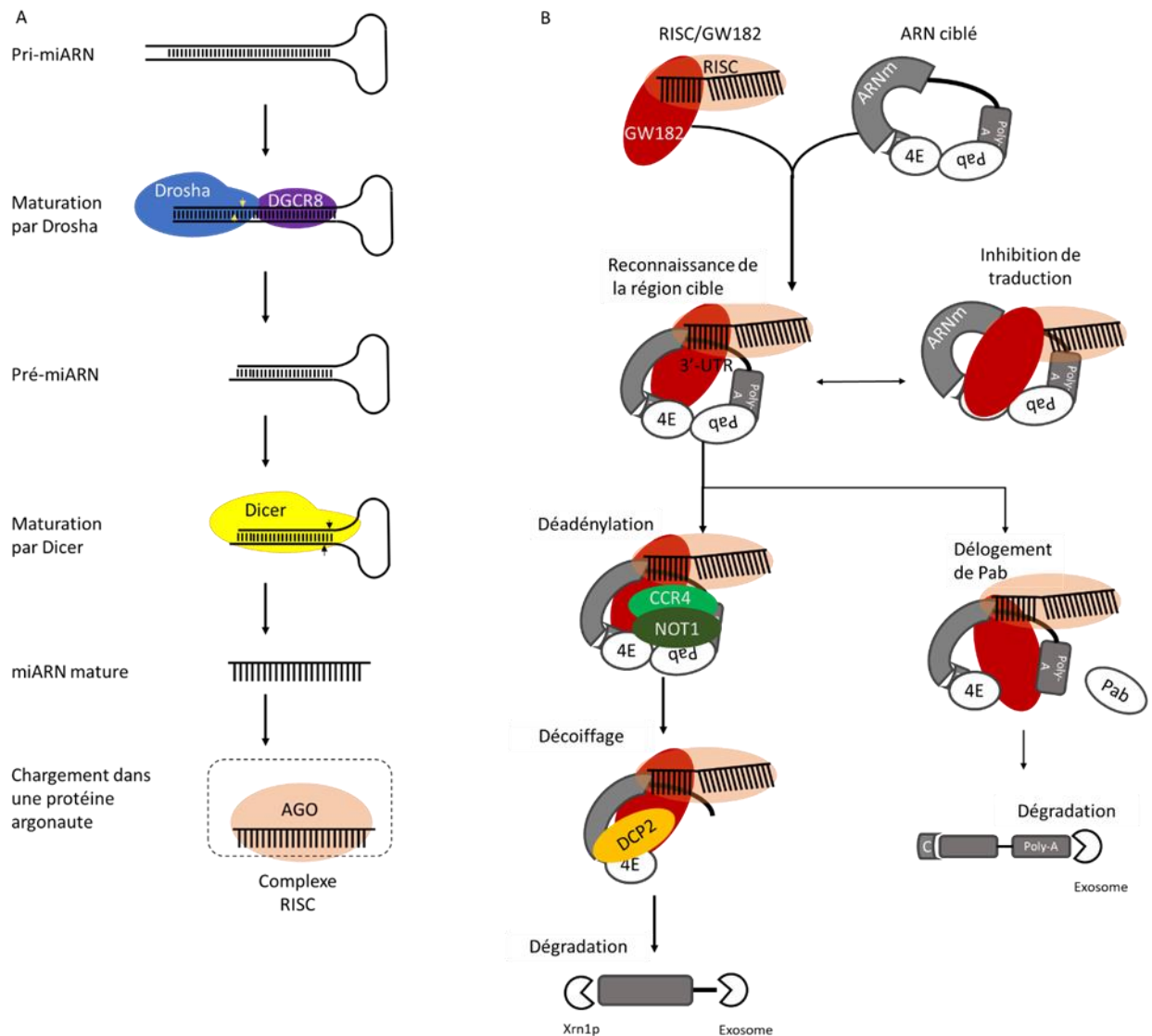


Figure 5 : Maturation et mécanisme d'interférence des miARN.

A) Résumé des étapes de maturation des miARN. Le micro ARN primaire subit deux étapes de clivage avant d'être chargé dans une protéine argonaute pour former le complexe RISC.

B) Le complexe RISC reconnaît une séquence dans le 3' UTR d'un ARNm. Un partenaire d'interaction de RISC, GW182 va par la suite inhiber la traduction, déloger la protéine Pab ou recruter des facteurs de déadénylation et de décoiffage de l'ARN.

1

2 **3.4 Les mécanismes de contrôle de qualité assurent la dégradation des** 3 **transcrits anormaux**

4

5 La prochaine section détaille les mécanismes mis en place pour assurer le contrôle
6 de qualité des ARN ayant une erreur lors des étapes de biogenèse et de maturation.
7 Les mécanismes de contrôle de qualité des ARNm sont résumés à la figure 6.

8

9 **3.4.1 Défaut au niveau de l'initiation ou l'arrêt de transcription**

10

11 Lors de l'initiation de la transcription, une transcription débutée dans une région
12 intergénique ou en dehors du promoteur peut survenir et produire un transcrit dit
13 cryptique. Ces transcrits peuvent être pris en charge de deux façons. Premièrement,
14 une partie des transcrits cryptiques sont reconnus par le complexe TRAMP
15 (Trf4p/Air2p/Mtr4p) et polyadénylés. Cette polyadénylation n'est pas couplée avec
16 l'assemblage d'une protéine liant le poly-A (comme Pab1p pour les ARNm), donc le
17 3' de cet ARN n'est pas stabilisé. Au contraire, cet oligoadénine est rapidement liée
18 et dégradée par l'exosome nucléaire en utilisant l'activité catalytique de Rrp6p
19 (LaCava et al., 2005). Un deuxième mécanisme de dégradation des transcrits
20 cryptiques intervient lorsque ceux-ci sont relativement longs et maturés comme un
21 ARNm. Dans ce cas, le codon d'initiation de la traduction sera hors cadre. Par
22 conséquent, ce changement de cadre de lecture occasionne un codon-stop prématuré
23 ou l'absence de codon-stop. Cette aberration est reconnue par des mécanismes de
24 contrôle liés à la traduction comme la dégradation non-sens (Nonsense Mediated
25 Decay, NMD) ou dégradation sans arrêt (non-stop decay, NSD) (Thompson and
26 Parker, 2007; Toesca et al., 2011) (Ces systèmes de contrôle de qualité sont détaillés
27 plus loin).

1

2 Lorsque la polymérase ne reconnaît pas le site de terminaison de transcription, deux
3 mécanismes peuvent prendre en charge ces transcrits envahissants. Premièrement,
4 l'ARN dépasse le site de polyadénylation normal et un site de reconnaissance pour
5 une RNase est transcrit (Ghazal et al., 2009). Ce cas a été démontré pour le gène
6 *NPL3* dans lequel le défaut de terminaison au site poly-A normal mène à la
7 transcription d'une tige-boucle qui est reconnue et clivée par la RNase III de la levure
8 (Rnt1p). Il est intéressant de mentionner que la protéine Npl3p inhibe la terminaison
9 normale de son propre gène et ce mécanisme participe ainsi à une boucle régulatrice.
10 Le second mécanisme implique la reconnaissance par TRAMP et la dégradation
11 nucléaire par l'exosome par le même mécanisme que les transcrits cryptiques.

12

13 **3.4.2 Défaut au niveau de la coiffe ou la queue poly-A**

14

15 La coiffe et la queue poly-A des ARNm exercent un rôle de protection et permettent
16 la circularisation des ARNm au cytoplasme pour faciliter la traduction. Les ARNm sans
17 coiffe ou de queue poly-A sont très instables et susceptibles à la dégradation par les
18 exoribonucléases nucléaires comme Rat1p ou l'exosome (Parker, 2012). De plus, la
19 polyadénylation est liée à l'arrêt de transcription et un défaut de polyadénylation va
20 souvent produire des transcrits envahissants qui sont reconnus par le complexe
21 TRAMP puis dégradés par l'exosome comme nous l'avons discuté précédemment

22

23 **3.4.3 Défaut au niveau de l'épissage**

24

25 Dans certains cas, l'intron possède un site reconnu par une endoribonucléase, qui va
26 réaliser le clivage initial de l'intron. Cet exemple a été démontré pour les transcrits

1 primaires des gènes *RPS22B* et *RPL18B* (Danin-Kreiselman et al., 2003). Dans ces
2 deux cas, l'intron possède une structure reconnue et clivée par la protéine Rnt1p. Lors
3 de la rétention d'intron, la coupure par Rnt1p va induire la dégradation du transcrit par
4 Rat1p et l'exosome. Les ARNm avec des introns peuvent aussi être retenus au noyau.
5 Cette rétention nucléaire est dépendante de la protéine Mlp1p et la pause de l'export
6 d'un transcrit permet de compléter l'épissage de celui-ci ou de le dégrader (Galy et
7 al., 2004). Le mécanisme le plus souvent retrouvé pour assurer la dégradation des
8 ARNm non épissés reste la dégradation non-sens. L'intron possède soit un codon-
9 stop en sa séquence ou la rétention de l'intron change le cadre de lecture pour générer
10 un codon-stop prématuré.

12 **3.4.4 Le contrôle de qualité lié à la traduction.**

13
14 La dégradation non-sens (NMD) dégrade plusieurs événements aberrants de
15 terminaison de traduction. Ce mécanisme est déclenché par un codon-stop prématuré
16 qui arrête le ribosome sur l'ARNm. Cet arrêt loin du 3'-UTR et de la queue poly-A va
17 être reconnu par la protéine Upf1p (Baker and Parker, 2004). Cette protéine recrute
18 le protéasome qui va provoquer la dégradation du peptide naissant pour empêcher
19 l'expression d'une protéine tronquée ou aberrante et les facteurs d'initiation de
20 traduction sont aussi retirés de l'ARNm. Les protéines Upf2p/Upf3p interagissent avec
21 Upf1p pour recruter le complexe de déadénylation et de décoiffage de l'ARNm, la
22 dégradation subséquente de l'ARNm est assurée par Xrn1p en direction 5'-3' et par
23 l'exosome en direction 3'-5'. À l'inverse, la dégradation sans arrêt (NSD) survient
24 lorsque le ribosome ne rencontre pas de codon-stop et se rend donc jusqu'à la queue
25 poly-A de l'ARNm (van Hoof et al., 2000b). Cet événement provoque alors la
26 dégradation du peptide traduit par le ribosome et une dégradation de l'ARNm médiée
27 par les protéines Ski2/3/7/8.

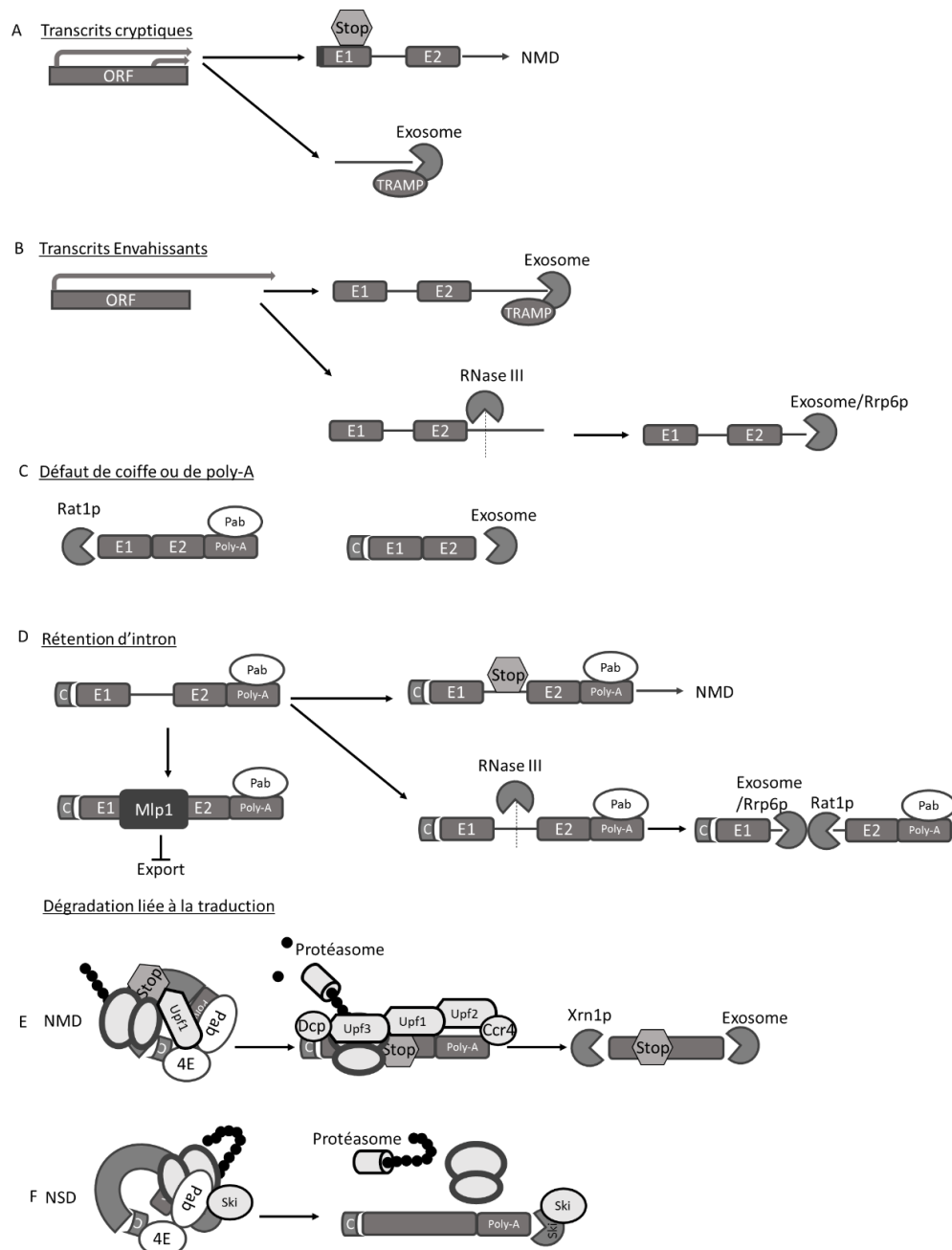


Figure 6 : Mécanismes de contrôle de qualité des ARN.

A) les transcrits cryptiques sont dégradés par la voie du NMD ou par l'action de TRAMP et de l'exosome. B) Les transcrit envahissants sont dégradé par un site reconnu par une RNase III ou l'action de TRAMP et de l'exosome. C) Les transcrits sans coiffe ou queue poly-A sont rapidement dégradés par les exonucléases. D) La rétention d'intron mène à la dégradation par le NMD, le clivage par une RNase III ou la rétention au noyau. E) Les ARNm ayant un codon-stop prématuré sont reconnus par les protéines UPF et dégradés. F) Les ARNm sans codon-stop sont reconnus par les protéines Ski et dégradés.

3.4.5 Le contrôle de qualité des ARNnc

Le contrôle de qualité des ARNnc est étroitement lié à leur maturation durant laquelle la majorité des ARNnc subissent plusieurs étapes de clivage et d'élagage. Ces étapes ont un double rôle, car elles assurent à la fois la maturation des ARN structurés et assemblés de manière correcte et permettent de dégrader les ARN qui ne sont pas assemblés convenablement (Parker, 2012). Au moins deux modes d'action ont été décrits pour initier la dégradation. Premièrement, une coupure endonucléolytique crée un point d'accès pour les exoribonucléases qui effectuent l'élagage. Ce mode d'action correspond à celui utilisé pour les sites de clivage A3, B0 et C dans le ribosome ou la coupure en 5' des ARNno. Un autre moyen d'induire la dégradation est d'effectuer un élagage 3'-5' suite à l'arrêt de transcription ou suite à la polyadénylation par le complexe TRAMP (Fang et al., 2005a). Par exemple, l'ARNr 5S subit l'action de la protéine Rex1p suite à son arrêt de transcription et plusieurs ARNt sont maturés suite à l'action du complexe TRAMP et de l'exosome (Fernández-Pevida et al., 2015). Dans ces cas, les ARNnc assemblés en complexes ribonucléoprotéiques ou avec une structure stable arrêtent l'action de l'exoribonucléase au site de maturation et un défaut d'assemblage ou de repliement mène à la destruction du transcrit.

4 Les RNases III sont une famille d'enzyme conservée et qui est caractérisée par un domaine RIIID

Les RNases III ont initialement été décrites chez la bactérie *E. Coli* comme étant des RNases spécifiques aux ARNdb (Robertson et al., 1968). Cette classe de protéines se retrouve dans tous les domaines du vivant à l'exception des archéobactéries. La famille des RNases III est habituellement divisée en quatre classes (Figure 7) (Lamontagne et al., 2001). La classe I comprend les membres les plus simples de cette famille qui correspond aux enzymes retrouvées chez les bactéries. Ces enzymes sont composées d'un domaine catalytique des RNases III (RIIID) et d'un domaine de liaison à l'ARN (dsRBD). Les enzymes de classe II correspondent à ceux retrouvées chez les eucaryotes simples, comme Rnt1p de *S.cerevisiae* et Dcr1p de *Kluyveromyces polyspora* (Drinnenberg et al., 2009; Elela et al., 1996). Ces enzymes ont comme particularité d'avoir une extension additionnelle dans leur partie N-terminale (Lamontagne et al., 2000). Les enzymes de classe III et IV sont retrouvés chez les mammifères et correspondent respectivement à Drosha et Dicer chez l'humain (Bernstein et al., 2001; Lee et al., 2003). Ces enzymes possèdent un dédoublement du domaine RIIID et des domaines protéiques additionnels dans leur partie N-terminale, permettant d'établir plusieurs interactions avec d'autres protéines et de lier l'ARN. Le domaine commun à chaque classe est le domaine RIIID. Ce domaine possède quatre résidus acides qui vont coordonner deux ions magnésium au site de clivage afin de provoquer l'hydrolyse de l'ARN. Cette coupure génère une extrémité 5'-phosphate et 3' hydroxyle. Le domaine RIIID se dimérise par une interface hydrophobe pour provoquer un clivage sur chaque brin d'ARN. Chez les enzymes de classe I et II, cette interaction mène à la dimérisation de la protéine alors que chez les enzymes de classe III et IV, la dimérisation est intramoléculaire.

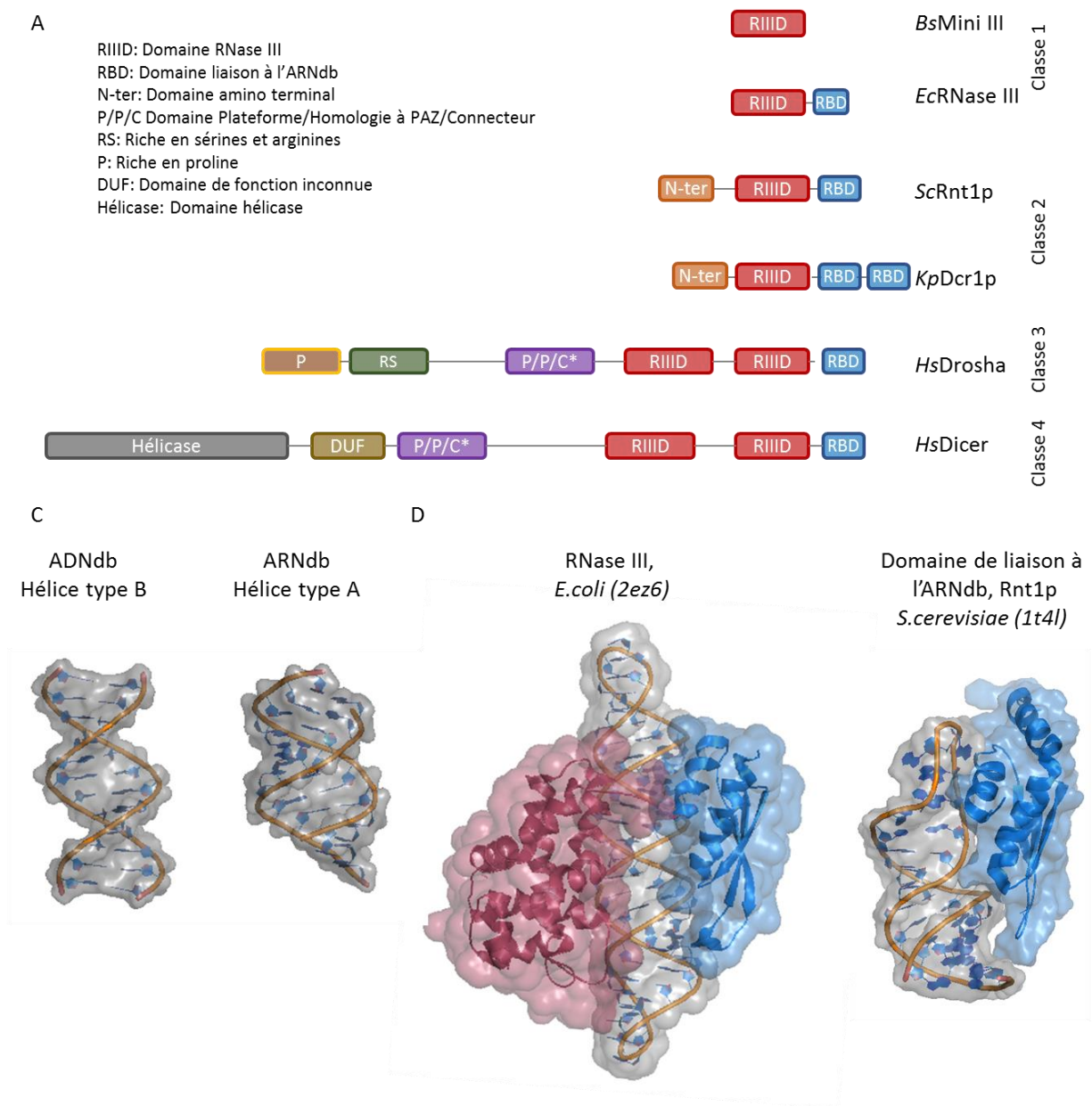


Figure 7 : les RNases III sont une famille d'enzyme qui reconnaît l'ARNdb.

A) Représentation des quatre classes de RNase III B) Structure d'une hélice de 12 paires de bases d'ADN et d'ARN. C) Structure de la RNase III et de Rnt1p liés à un ARN. Pour la RNase III le domaine nucléase est en rouge et pour les deux structures le domaine de liaison à l'ARNdb est en bleu et l'ARN en gris. Le numéro d'identification pdb entre parenthèses.

4.3 L'architecture protéique des RNases III permet une liaison indépendante de la catalyse.

Le deuxième domaine typique aux RNases III est le domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD). Ce domaine, qui est défini par une structure tertiaire $\alpha\beta\beta\alpha$, n'est pas unique aux RNases III et est retrouvé dans d'autres protéines liant l'ARN dont Staufén, impliquée dans la localisation cellulaire des ARN (Johnston et al., 1992). Ce domaine interagit spécifiquement avec l'ARN double-brin en reconnaissant l'hélice d'ARN (hélice de type A) qui est différente de l'hélice d'ADN (hélice de type B) (Ryter and Schultz, 1998) (Figure 7). La différence majeure entre ces deux types d'hélices est la distance et la largeur des sillons. Le domaine dsRBD reconnaît spécifiquement l'ARNdb de cette façon, notamment à l'aide d'un réseau d'interaction au sillon mineur de l'ARN. Ce domaine est aussi présent dans presque toutes les RNases III identifiées (Nicholson, 2014) et est relié au domaine RIID par un lien d'une dizaine d'acides aminés chez Rnt1p (Elela et al., 1996). Cet arrangement sépare les deux domaines et permet une reconnaissance de l'ARN indépendante de la catalyse. Plusieurs expériences tendent à démontrer ce concept. De manière très simple, il est facile de découpler la liaison, dépendante du dsRBD, de l'activité catalytique, dépendante du domaine RIID, en utilisant un mélange réactionnel qui ne contient pas de magnésium (Lamontagne et al., 2000). Dans cette condition, l'enzyme est tout de même capable de lier les ARN, mais sans ions divalents, l'ARN n'est pas clivé. D'un côté structural, la première structure cristalline d'une RNase III a été obtenue avec une protéine mutée pour le site catalytique. Dans ce cristal, l'ARN est lié au dsRBD en dehors du site catalytique (Blaszczyk et al., 2004). De plus, les travaux du laboratoire d'Alan Nicholson sur la RNase III bactérienne ont démontré que le clivage des substrats était influencé par certaines séquences, appelées déterminants et anti-déterminants de réaction, et que certaines séquences restrictives pour le clivage n'affectaient pas la liaison avec l'enzyme (Pertzev and Nicholson, 2006). Le même groupe de recherche a aussi démontré que dans le cas d'une protéine tronquée pour le dsRBD, le domaine

1 RIIID était tout de même capable de cliver l'ARNdb (Sun et al., 2001). Les travaux de
2 notre laboratoire effectués par Bruno Lamontagne sur la RNase de type III de
3 *S.cerevisiae* ont aussi établi qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'affinité et
4 l'efficacité de clivage des substrats par Rnt1p. Plusieurs ARN ayant une forte affinité
5 pour l'enzyme ne génèrent pas un clivage efficace ce qui suggère que les épitopes
6 d'affinité et de réactivité sont distincts (Lamontagne and Elela, 2004; Lamontagne et
7 al., 2004). Ces informations suggèrent que la liaison des RNases III à leurs substrats
8 et le clivage de l'ARN, quoi qu'étant deux étapes successives, seraient régulés
9 indépendamment.

10

11

12

5. Rnt1p, la ribonucléase de type III de *Saccharomyces cerevisiae*

Les ribonucléases de type III sont des endonucléases clivant les ARNdb avec des implications importantes dans la dégradation et la maturation de l'ARN (Nicholson, 2014). Rnt1p est un membre de cette famille de protéines retrouvée chez la levure bourgeonnante (Elela et al., 1996). Rnt1p est impliqué dans la dégradation d'ARNm, la terminaison de transcription et la maturation d'une grande part des ARNnc présents chez cette levure (Tableau 1). L'importance et la variété des rôles physiologiques de cette classe d'enzyme en font un sujet d'étude particulièrement pertinent et la présente section est consacrée uniquement à cette famille d'enzyme.

5.1 *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle d'étude du métabolisme de l'ARN

Un des organismes modèles les plus utilisés dans l'étude du métabolisme de l'ARN est la levure bourgeonnante *S.cerevisiae* (Parker and Song, 2004). La facilité à réaliser des manipulations génétiques, le temps de division et l'accessibilité à une banque abondante de mutations en fait un modèle d'étude de choix pour le travail en laboratoire (Duina et al., 2014). De plus, plusieurs aspects du métabolisme de l'ARN sont conservés chez tous les eucaryotes. À titre d'exemple, l'ARNr 18S de l'humain est identique à plus de 75% avec celui de *S.cerevisiae*, et la structure formée par cet ARN est bien conservée. La majorité des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN de *S.cerevisiae* ont un orthologue chez l'humain et plusieurs mécanismes de maturation et de contrôle de qualité de l'ARN sont conservés (Duina et al., 2014; Parker, 2012)

1 **Tableau 1 : Rôles de Rnt1p dans le métabolisme de l'ARN.**

2 Pour chaque cible le rôle de Rnt1p sur cet ARN et les références pertinentes sont indiqués.

3

Cible	Rôle de Rnt1p	Référence
Précurseur d'ARNr 35S (transcrit polycistronique 18S/5.8S/25S)	Maturation d'ARNnc	(Elela et al., 1996)
ARNn (U1, U2, U4, U5)	Maturation d'ARNnc	(Chanfreau et al., 1997; Elela and Ares, 1998; van Hoof et al., 2000a; Seipelt et al., 1999)
ARNno (33 cibles)	Maturation d'ARNnc	(Chanfreau et al., 1998; Ghazal et al., 2005; Qu et al., 1999)
Introns (<i>RPL18A</i> , <i>RPL22B</i>)	Dégradation d'ARNm lors de rétention d'intron.	(Danin-Kreiselman et al., 2003)
ARNm lié au glucose (<i>MIG2</i> , <i>RGT1</i> , <i>MTH1</i>)	Dégradation d'ARNm en réponse aux sucres	(Ge et al., 2005; Lavoie et al., 2011)
Terminaison de transcription (<i>NPL3</i>)	Terminaison/dégradation en absence de terminaison liée au poly-A.	(Ghazal et al., 2009)

4

5.2 Rnt1p reconnaît spécifiquement les tétraboucles NGNN et AAGU.

La présence de tétraboucles AGNN a rapidement été identifiée comme signal de maturation de l'ARNr, des ARNn et des ARNno (Chanfreau et al., 1997; Elela et al., 1996; Nagel and Ares, 2000). La mutation de la guanine en deuxième position de ce motif a un impact drastique sur la liaison par Rnt1p et la catalyse. La mutation de l'adénine en position 1 de la tétraboucle a un impact beaucoup moins important sur la reconnaissance par Rnt1p, malgré une affinité légèrement réduite. Par ailleurs, l'identification d'un signal de maturation n'ayant pas d'adénine en position 1 pour la maturation de l'ARNn U1 a été démontrée (Seipelt et al., 1999). Ceci a mené à la définition des substrats canoniques de Rnt1p, caractérisés par des tige-boucles d'ARN possédant une tétraboucle NGNN. Préalablement aux travaux présentés dans cette thèse, les analyses de la structure des substrats et de Rnt1p ont été effectuées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). L'analyse d'une tige de 9 paires de bases ayant des boucles AGUC ou AGAA, qui correspondent à la boucle retrouvée sur le précurseur de U5 et de snR47, a révélé que ce type de tétraboucle possède un repliement particulier semblable à celui d'une tétraboucle UGAA, suggérant une structure propre aux tétraboucles NGNN (Lebars et al., 2001). La première et la quatrième position de la boucle forment une interaction non canonique. La seconde position correspondante à la guanine conservée adopte une conformation *syn*, et est exposée au solvant à l'extérieur de la structure. La structure de la boucle tourne entre la position 2 et 3 pour revenir vers la position 4 qui est alignée avec le brin complémentaire. Cette première analyse portait à croire que ce repliement particulier permet à la guanine exposée au solvant d'être reconnue par Rnt1p. Paradoxalement, la structure RMN du dsRBD de Rnt1p lié à un substrat a plutôt révélé une interaction entre l'hélice $\alpha 1$ et le sillon mineur formé par la boucle et les paires de bases adjacentes (Figure 7) (Wu et al., 2004). Une deuxième classe de tétraboucles a aussi été identifiée à partir du précurseur de l'ARNno snR48 qui possède une tétraboucle AAGU (Ghazal and Elela, 2006). Cette tétraboucle a un

1 repliement légèrement différent des NGNN (notamment la deuxième base en position
2 *anti*) (Gaudin et al., 2006), mais le squelette de l'ARN subit un changement de
3 structure une fois lié au dsRBD de Rnt1p (Wang et al., 2011) pour adopter une
4 conformation se rapprochant beaucoup du complexe Rnt1p :tétraboucle NGNN
5 (Figure 7).

6 7 **5.3 La liaison et l'activité catalytique de Rnt1p sont influencées par deux régions** 8 **distinctes sur l'ARN.**

9
10 En plus de la préférence pour les tétraboucles de type NGNN ou AAGU, l'activité de
11 Rnt1p est influencée par deux régions de l'ARN (Figure 7). Les nucléotides présents
12 dans la tétraboucle et les quatre paires de bases proximales à la boucle constituent
13 la région de liaison initiale et de stabilité de liaison. La mutation de la boucle ou
14 l'insertion de mésappariement dans les quatre premières paires de bases ont un effet
15 marqué sur la liaison et par conséquent sur le clivage subséquent. Par ailleurs, cette
16 région constitue un élément de liaison minimale, car Rnt1p peut lier de manière stable
17 un petit ARN constitué seulement d'une tétraboucle NGNN et de cinq paires de bases.
18 Une deuxième région où la séquence de l'ARN semble avoir un impact sur l'activité
19 de Rnt1p est celle entourant le site de clivage. Les six paires de bases centrées sur
20 les sites de clivage de Rnt1p constituent la région d'efficacité de clivage. Il a été
21 démontré que la présence de paires de bases G/C avait un effet délétère sur le clivage
22 par Rnt1p sans affecter la liaison (Lamontagne and Elela, 2004). Ces observations
23 ont aussi été confirmées par l'utilisation de tiges clivées par Rnt1p en biologie
24 synthétique. Une librairie de tiges d'ARN contenant une séquence clivée par Rnt1p
25 avec une région d'efficacité de clivage variable permet de moduler le clivage *in vivo*
26 entre 17 et 88% dépendamment de la séquence utilisée (Babiskin and Smolke, 2011a,
27 2011b).

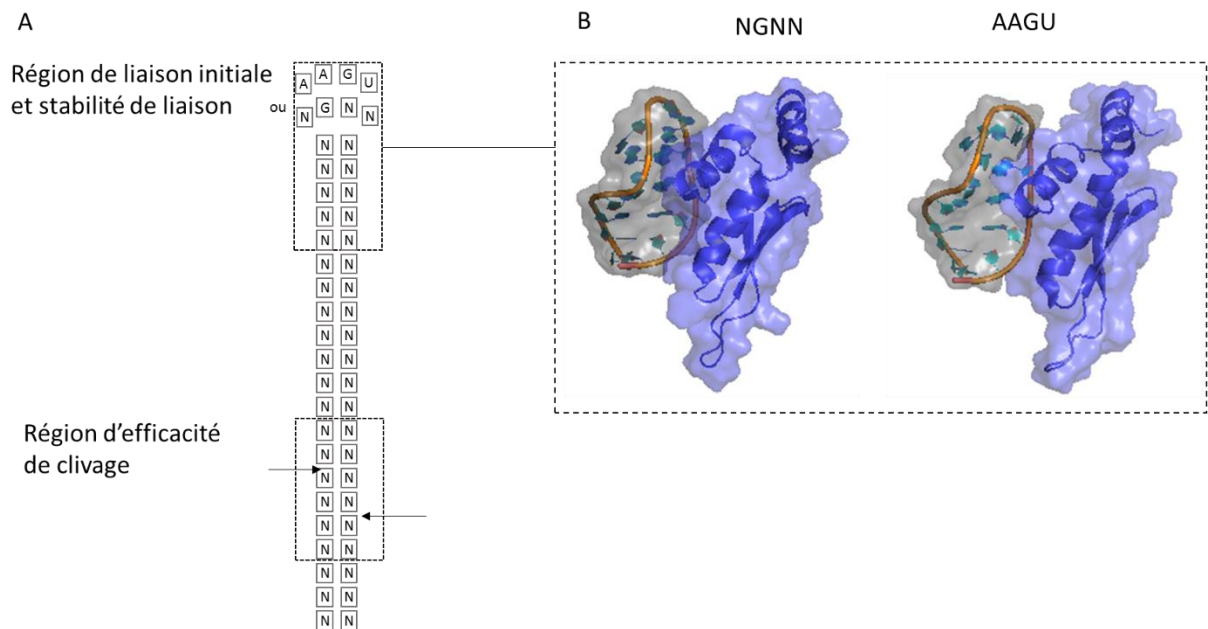


Figure 8 : L'activité de Rnt1p dépend de deux régions sur l'ARN.

A) Représentation d'un substrat de Rnt1p typique. Les régions influençant la liaison ou le clivage par Rnt1p sont indiquées. B) Reconnaissance par Rnt1p d'une boucle NGNN (1T4L) ou AAGU (2LBS) et des cinq paires de bases adjacentes à la boucle.

6. Objectifs du projet

La dégradation et la maturation de l'ARN sont des phénomènes essentiels et conservés chez tous les êtres vivants. Le but général de cette thèse est de mieux comprendre les facteurs influençant la sélection et la dégradation d'ARN en prenant Rnt1p comme modèle d'étude. Plus spécifiquement, il s'agit d'utiliser ce dernier afin de déterminer par quel mécanisme Rnt1p sélectionne ses substrats et de quelle manière l'activité catalytique est modulée.

1 Bien que plusieurs observations démontrent que Rnt1p est spécifique aux
2 tétraboucles NGNN, aucune étude structurale jusqu'à maintenant n'a réussi à mettre
3 en lumière le rôle réel de la guanine conservée dans la tétraboucle. De plus, les
4 informations disponibles à ce sujet n'ont été obtenues qu'à partir de protéines
5 tronquées et jamais sur la protéine entière. L'objectif du chapitre 2 est de comprendre
6 de quelle façon Rnt1p discrimine les ARN ayant une tétraboucle NGNN et détermine
7 le site de clivage. Afin de répondre à cette question nous avons collaboré avec le
8 laboratoire de Xinhua Ji pour obtenir la structure cristalline de Rnt1p lié à un ARN. Ce
9 résultat, combiné avec une caractérisation biochimique de plusieurs mutants et de
10 plusieurs ARN nous permettent d'établir un mécanisme de reconnaissance et
11 d'identifier les motifs et les résidus nécessaires à la reconnaissance de l'ARN.

12
13 Malgré que la majorité des substrats de Rnt1p possèdent une tétraboucle NGNN, des
14 différences majeures ont été observées dans leur rôle cellulaire, leur abondance et
15 dans le niveau de clivage par Rnt1p *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, notre compréhension
16 du phénomène reste embryonnaire et aucun mécanisme précis n'a été décrit pour
17 expliquer les différences observées entre la réactivité des différents substrats.
18 L'objectif du chapitre 3 est de comprendre par quel mécanisme Rnt1p module son
19 activité envers différents substrats. Cet objectif sera répondu à l'aide de l'utilisation de
20 cinétiques en temps réel, de permutations entre les substrats et de l'étude des
21 propriétés de liaison des produits de réaction.

CHAPITRE 2

La structure de Rnt1p lié à un ARN révèle les mécanismes de sélection des substrats et de déterminations des sites de clivages.

Les études structurales sur les RNases III bactériennes ont permis d'obtenir énormément d'information sur ceux-ci : le mécanisme d'action, les motifs de liaison à l'ARN, le rôle de la dimérisation, et l'arrangement des domaines sur l'ARNdb. Cependant, le modèle bactérien a plusieurs limites. La majorité des RNases III présentes chez les eucaryotes sont habituellement plus complexes que ceux des bactéries et possèdent des domaines additionnels dans leur partie N-terminale. Aussi, Rnt1p est connue pour exhiber une spécificité envers les tétraboucles de type NGNN, spécificité qui n'est pas expliquée par les structures des cristaux publiés jusqu'à maintenant. En collaboration avec le laboratoire de Xinhua Ji, nous avons entrepris de déterminer la structure de Rnt1p à l'aide d'un cristal. Les résultats ont démontré que deux acides aminés supplémentaires, conservés chez les eucaryotes, sont présents au site catalytique de Rnt1p. Cette structure révèle aussi que Rnt1p utilise un réseau de motif d'interaction à l'ARN (RBM). En plus des quatre RBM qui sont aussi présents chez les RNases III bactériennes, un cinquième motif est présent dans l'extension en c-terminale du domaine de liaison à l'ARN de Rnt1p. Ce motif adopte une structure particulière qui effectue un réseau d'interaction avec la guanine conservée de la tétraboucle et a donc été nommé G-Clamp ou pince à guanine. La structure démontre aussi que les domaines N-terminaux de chaque sous-unité du dimère de Rnt1p se dimérisent et interagissent avec la boucle de l'ARN. De cette façon la position des sites de clivages par Rnt1p est déterminée par la position du domaine N-terminal et du domaine dsRBD à la boucle.

1

2 Les résultats de cet article sont importants sur plusieurs points :

- 3 - Il s'agit du premier cristal du cœur catalytique d'une RNase III eucaryotique lié à
4 un ARN.
- 5 - Cet article démontre de quelle manière Rnt1p effectue le clivage sur l'ARN à
6 précisément 14 nucléotides et 16 nucléotides de la boucle.
- 7 - Cet article démontre l'importance des motifs de liaison à l'ARN de Rnt1p et permet
8 d'expliquer la reconnaissance des tétraboucles NGNN à l'aide du RBM0 (G-
9 clamp).

10

11 Afin de comprendre la pertinence des interactions répertoriées dans le cristal, j'ai
12 effectué une caractérisation de la liaison et de la catalyse sur deux types de substrats
13 (long et court) pour la protéine de type sauvage et 10 mutants qui sont répartis au
14 travers des motifs de liaison présents dans le domaine de liaison à l'ARNdb. J'ai aussi
15 vérifié l'impact du changement de la guanine conservée pour d'autres purines afin de
16 vérifier l'importance des ponts hydrogènes formés avec cette base. Ces expériences
17 ont mené aux figures 3D, 3F, 4B, 4D, 5E, ainsi que les données présentées dans la
18 table supplémentaire 1. Yu-He Liang a réalisé le cristal de Rnt1p et Mathieu Lavoie
19 les autres expériences biochimiques de cet article. La première version du manuscrit
20 a été écrite par Sherif Abou Elela et Xinhua Ji et j'ai participé aux multiples révisions
21 subséquentes.

22

23 Référence complète : Liang, Y.H., Lavoie, M., Comeau, M.A., Abou Elela, S., and Ji, X.
24 (2014). Structure of a eukaryotic RNase III postcleavage complex reveals a double- ruler
25 mechanism for substrate selection. *Mol. Cell* 54, 431–444.

26

Structure of a Eukaryotic RNase III Postcleavage Complex Reveals a Double-Ruler Mechanism for Substrate Selection

Yu-He Liang,¹ Mathieu Lavoie,² Marc-Andre Comeau,² Sherif Abou Elela,^{2,*} and Xinhua Ji ^{1,* 1}

¹ Biomolecular Structure Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

² RNA Group/Groupe ARN, Département de microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1E 4K8, Canada

*Correspondence: sherif.abou.elela@usherbrooke.ca (S.A.E.), jix@mail.nih.gov (X.J.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.006>

SUMMARY

RNase III represents a family of dsRNA-specific endoribonucleases required for RNA maturation and gene regulation. The mechanism of action has been well characterized for the bacterial enzyme, but is not clear for eukaryotic RNase IIIs. Here, we describe the structure of *Saccharomyces cerevisiae* RNase III (Rnt1p) post-cleavage complex and explain the basis of its affinity for RNA stems capped with an NGNN tetraloop. The structure shows specific interactions between a new structural motif located at the end of Rnt1p dsRNA-binding domain (dsRBD) and the guanine nucleotide in the second position of the loop. Strikingly, structural and biochemical analyses indicate that the dsRBD and N-terminal domain function as two rulers measuring the distance between the tetraloop and the cleavage site. This unusual mechanism of substrate selectivity represents an example of the evolution of substrate selectivity and provides a framework for understanding the mechanism of action of eukaryotic RNase IIIs.

1 INTRODUCTION

2
3 Members of the RNase III family are involved in RNA interference (RNAi) (Hutvagner
4 and Zamore, 2002) and RNA maturation (Court, 1993; Lamontagne et al., 2001;
5 Nicholson, 1999). RNase IIIs are found in all species except archaeobacteria (Lykke-
6 Andersen and Garrett, 1997). The family members are identified by their homology to
7 the *Escherichia coli* RNase III (Robertson et al., 1968) and can be divided into four
8 classes (Lamontagne et al., 2001; Nicholson, 2003) based on protein features (Figure
9 1A). Typically, class I enzymes possess a single RNase III domain (RIIID) followed by
10 a dsRNA-binding domain (dsRBD); class II is defined by the presence of an N-terminal
11 domain (NTD), a RIIID, and a dsRBD; class III enzymes contain N-terminal P-rich and
12 RS-rich domains followed by two RIIIDs and a dsRBD (Lee et al., 2003); and class IV
13 possesses N-terminal helicase, DUF283, and PAZ domains followed by two RIIIDs
14 and a dsRBD (Zhang et al., 2002). It is the N-terminal extension (NTE) beyond the
15 RIIID that distinguishes eukaryotic RNase IIIs (classes II–IV) from bacterial enzymes
16 (class I).

17
18 Dicer produces small interfering (si) and micro (mi) RNAs involved in mediating RNAi.
19 The precursor of siRNA is long dsRNA, whereas that of miRNA is pre-miRNA, a stem-
20 loop structure produced by Drosha from an RNA primary transcript known as pri-RNA.
21 Bacterial RNase III can function as either a processing enzyme (Court, 1993) or a
22 binding protein (Oppenheim et al., 1993). As the only RNase III protein in
23 *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), Rnt1p is involved in the production of small nuclear
24 RNA (snRNA) (Abou Elela and Ares, 1998), pre-rRNA (Abou Elela et al., 1996), and
25 small nucleolar RNA (snoRNA) (Chanfreau et al., 1998). It is also involved in the
26 degradation of several mRNAs (Danin-Kreiselman et al., 2003; Meaux et al., 2011).
27 Deletion of RNT1 perturbs the cell cycle and growth, increases the telomere length,
28 inhibits ribosome production, impairs cell wall stress response, and induces

1 temperature sensitivity (Catala et al., 2008). While Rnt1p normally cleaves local stem
2 loop structure, it was shown that the enzyme could direct cleavage in trans by binding
3 to small guide RNA in analogy to the mechanism of RNAi, which is absent in *S.*
4 *cerevisiae* (Lamontagne and Abou Elela, 2007).

5
6 The structure and mechanism of bacterial RNase III have been well characterized
7 (Court et al., in press; Gan et al., 2008; Gan et al., 2006; Nicholson, 2011), whereas
8 those of the eukaryotic enzymes remain unclear. The structure and mechanism of
9 bacterial RNase III cannot explain the function of features unique for eukaryotic
10 enzymes like the NTE and the two additional side chains found in the cleavage site
11 (Du et al., 2008; Weinberg et al., 2011). Furthermore, several eukaryotic enzymes
12 developed affinity for substrates with a specific structure and sequence, which cannot
13 be explained by the basic mechanism of dsRNA recognition found in bacterial
14 enzyme. For example, Rnt1p does not cleave dsRNA under physiological conditions
15 but specifically recognizes short RNA hairpins with conserved NGNN tetraloops (G2-
16 loop, Lebars et al., 2001). Substrate recognition by Rnt1p is mediated by dsRBD, while
17 the cleavage is performed at a fixed distance from the tetraloop by RIIID (Ghazal and
18 Elela, 2006; Lamontagne and Elela, 2001; Lamontagne and Elela, 2004; Lamontagne
19 et al., 2003; Lamontagne et al., 2000). However, it is not clear how Rnt1p selects
20 these substrates and how the enzyme positions its cleavage site at a fixed distance
21 from the tetraloop. Until now, the exact contribution of the tetraloop, especially the
22 conserved guanine nucleotide, to substrate binding and cleavage is still being debated
23 (Ghazal and Elela, 2006; Hartman et al., 2013; Lavoie and Abou Elela, 2008; Wang
24 et al., 2011; Wu et al., 2004).

25
26 Here, we report the crystal structure of Rnt1p in complex with a G2-loop and explain
27 how the catalytic complex of eukaryotic RNase III is assembled and explain the basis
28 of Rnt1p affinity for short RNAs with specific structure and sequence. Surprisingly, a

1 new structural motif near the C-terminus of dsRBD specifically recognizes the
2 conserved guanine in the second position of the tetraloop. Intriguingly, the NTD acts
3 as a second ruler that measures together with the dsRBD the distance between the
4 tetraloop and the cleavage site.

6 **RESULTS**

8 **New Binding Mode of dsRNA by RNase III**

10 Recombinant Rnt1p was incubated with a 34-nucleotide (nt) RNA stem-loop (Figure
11 S1A). The resulting mixture yielded crystals of an Rnt1p:RNA complex. However, the
12 SDS-PAGE analysis of the crystal content indicated that the protein was degraded
13 into two fragments (Figure S1B), a 14-kDa fragment containing the NTD (residues 42–
14 151) and a 32-kDa fragment containing the RIIID and dsRBD (Δ NTD, residues 197–
15 457). The asymmetric unit contained an intertwined dimer of NTD, a Δ NTD, and a 34-
16 nt RNA (Figure S1C). It has been shown that the dimerization of RIIID is required for
17 dsRNA processing by bacterial RNase III in that side chains from both RIIID subunits
18 are involved in the cleavage of each RNA strand and the cleavage of both strands
19 creates the characteristic 2-nt 3' overhang in the product (Gan et al., 2006). Like
20 bacterial RNase III, Rnt1p also functions as a homodimer (Lamontagne et al., 2000).
21 Thus, the biological assembly of Rnt1p was obtained by expanding the asymmetric
22 unit via a crystallographic 2-fold axis. It revealed a Δ NTD dimer in complex with an
23 RNA pseudoduplex, formed by two 34-nt RNAs joined by their 2-nt 3' overhangs, and
24 two NTD dimers (Figure 1B). Similar to the *Aquifex aeolicus* RNase III (AaRNase
25 III):RNA complex (Gan et al., 2006), the Sc Δ NTD:RNA complex also contained a
26 pseudoduplex RNA formed by two product RNAs (Figure 1C). Unlike bacterial RNase
27 III, however, Rnt1p has the NTD (Figure 1A). The NTD, separated from the Δ NTD due

1 to protein degradation, formed an intertwined dimer recognizing both ends of the
2 Δ NTD:RNA complex (Figure 1B). The extra NTD is due to crystallization condition but
3 its position does not affect the biochemically predicted positioning of RIIID relative to
4 the cleavage site (*vide infra*).

5
6 The RIIID and dsRBD in both AaRNase III and Rnt1p are connected by a 7-residue
7 flexible linker (Figure S2). The structure of this linker is well defined in the Rnt1p:RNA
8 (this work) and AaRNase III:RNA (Gan et al., 2006) complexes. Comparison between
9 the Sc Δ NTD:RNA and AaRNase III:RNA structures shows that while the RIIID dimer
10 of the two enzymes adopt the same position relative to the RNA, the span of the two
11 dsRBDs differs by 66 Å (Figure 1C). This new conformation of the enzyme significantly
12 increases the buried surface between protein and RNA, which measures 5520 Å² in
13 the case of AaRNase III and 8372 Å² in the case of Sc Δ NTD. Thus, Rnt1p adopts a
14 novel RNA-binding mode that permits the recognition of the defining substrate
15 elements without disrupting the classical alignment of dsRNA with the two cleavage
16 sites in the RNase III catalytic complex.

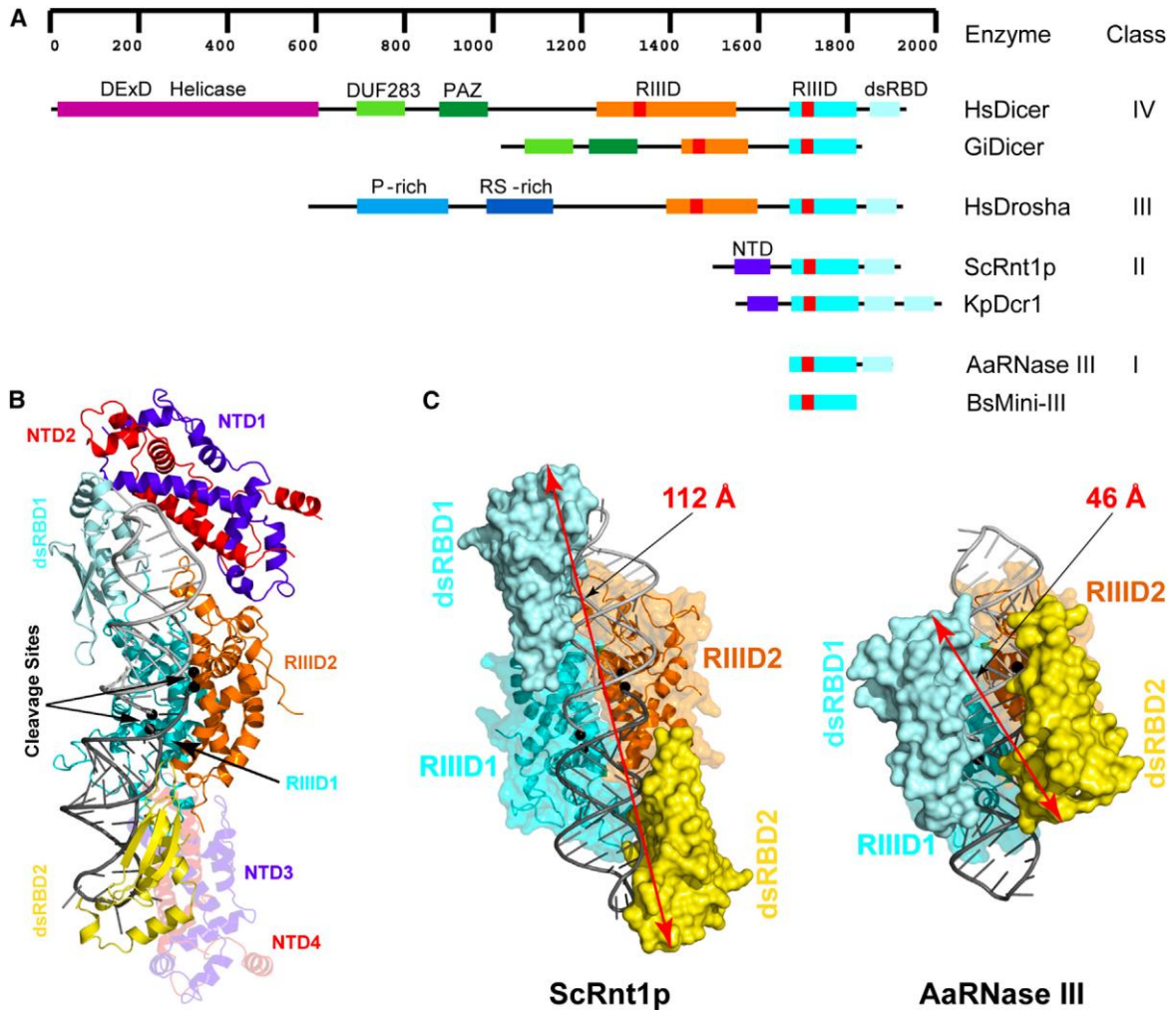


Figure 1: New Mode of Substrate Recognition by RNase III

(A) Domain structures are illustrated for Homo sapiens Dicer (HsDicer, UniProtKB Q9UPY3), Giardia intestinalis Dicer (GiDicer, UniProtKB A8BQJ3), Homo sapiens Drosha (HsDrosha, UniProtKB Q9NRR4), Saccharomyces cerevisiae Rnt1p (ScRnt1p, UniProtKB Q02555), Kluyveromyces polysporus Dcr1 (KpDcr1, UniProtKB A7TR32), Aquifex aeolicus RNase III (AaRNase III, UniProtKB O67082), and Bacillus subtilis Mini-III (BsMini-III, UniProtKB O31418). The scale on top indicates the polypeptide lengths. The red box in RIIID represents the RNase III signature sequence. (B) The Rnt1p:RNA complex contains two NTD dimers (blue/red), one RIIID dimer (cyan/orange), two dsRBDs (pale cyan/light orange), and two 34-nt RNAs (grey/dark grey) in addition to Mg²⁺ ions and solvent molecules (not shown). (C) Distinct modes of dsRNA recognition by ScRnt1p (left) and AaRNase III (right) are illustrated. The RIIIDs are shown as ribbon diagrams outlined with transparent molecular surfaces, dsRBDs as solid molecular surfaces, and RNAs as tube-and-stick models. The span of the two dsRBDs along dsRNA is indicated with a double-headed arrow. See also Figure S1.

Structure of Eukaryotic RNase III Post-Cleavage Complex

Unlike bacterial RNase III, the cleavage site of eukaryotic RNase III enzymes contains six conserved side chains (Figure 2A). The Rnt1p:RNA structure shows that the enzyme processes dsRNA by a single RNA cleavage event on each RNA strand to generate products with the 2-nt 3' overhang (Figure 2B, left). In the post-cleavage complex, each cleavage site is composed of the 3' - and 5'-termini of a cleaved RNA strand, two Mg²⁺ ions, four water molecules, and six catalytic side chains (Figure 2B, right). The distance between the 3'-hydroxyl oxygen and the 5'-phosphate phosphorus is 3.1 Å, which corresponds to the van der Waals distance between these two atoms. This arrangement of the RNA within the cleavage site indicates that the Rnt1p:RNA structure represents a catalytic stage immediately after the hydrolysis of the scissile bond. Statistics for the quality of the structure are listed in Table 1.

Table 1. Data Collection and Structure Refinement Statistics

Data Collection	
Wavelength (Å)	1.0
Space group	C2221
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	158.0, 183.8, 61.3
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	40-2.50 (2.65-2.50) ^a
Number of unique reflections	31,010 (4,870)
<i>R</i> _{merge} (%) ^b	6.6 (78.4)
<i>I</i> /σ	14.45 (1.82)
Completeness (%)	98.7 (97.5)

Redundancy	4.7 (4.3)
Structure Refinement	
Resolution	40-2.5 (2.63-2.50)
<i>R</i> work (%) ^c	21.6 (41.0)
<i>R</i> free (%) ^d	23.9 (40.8)
Number of Atoms	
Protein	4,081
RNA	574
Water	98
B factors	
Protein	81.5
RNA	58.9
Water	62.2
Root-mean-square deviation	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.777
Ramachandran plot	
Most favored region (%)	92.1
Additional allowed region (%)	6.5
Generously allowed region (%)	0.7
Disallowed region (%)	0.7
Resolution	40-2.5 (2.63-2.50)

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum I$, where I is the observed intensity.

^c $R_{\text{work}} = \sum hkl | |F_o| - |F_c| | / \sum hkl |F_o|$, calculated from working dataset.

^d R_{free} is calculated from 3% of data randomly chosen and not included in refinement.

5

6 All six catalytic residues conserved in eukaryotic RNase IIIs (N1, D2, D3, E4, N5, and
7 K6, Figure 2A) were well defined. The side chain of N5 was found to interact with two
8 water molecules and one oxygen of the 5' phosphate, while the side-chain ε-amino
9 group of K6 interacted with one oxygen of the 5' phosphate and another from the
10 carboxylic group of D3 (Figure 2B). The interaction of these two side chains with the

1 leaving phosphate group via specific hydrogen bonds indicate that they play important
2 roles in stabilizing the transition state.

3

4 Superposition of the Rnt1p:RNA and the AaRNase III:RNA (Gan et al., 2008)
5 structures showed identical positioning of the E1, D2, D3, and E4 side chains (Figure
6 2C). Comparison of the Rnt1p:RNA with three RNA-free eukaryotic RNase IIIs
7 (MacRae et al., 2006; Takeshita et al., 2007; Weinberg et al., 2011) revealed
8 substantial conformational changes of the D2, N5, and K6 side chains upon the
9 formation of cleavage site assembly (Figures 2D, 2E, and 2F), demonstrating that the
10 cleavage site assembly of eukaryotic RNase III is formed and configured for cleavage
11 only when all the components are present.

12

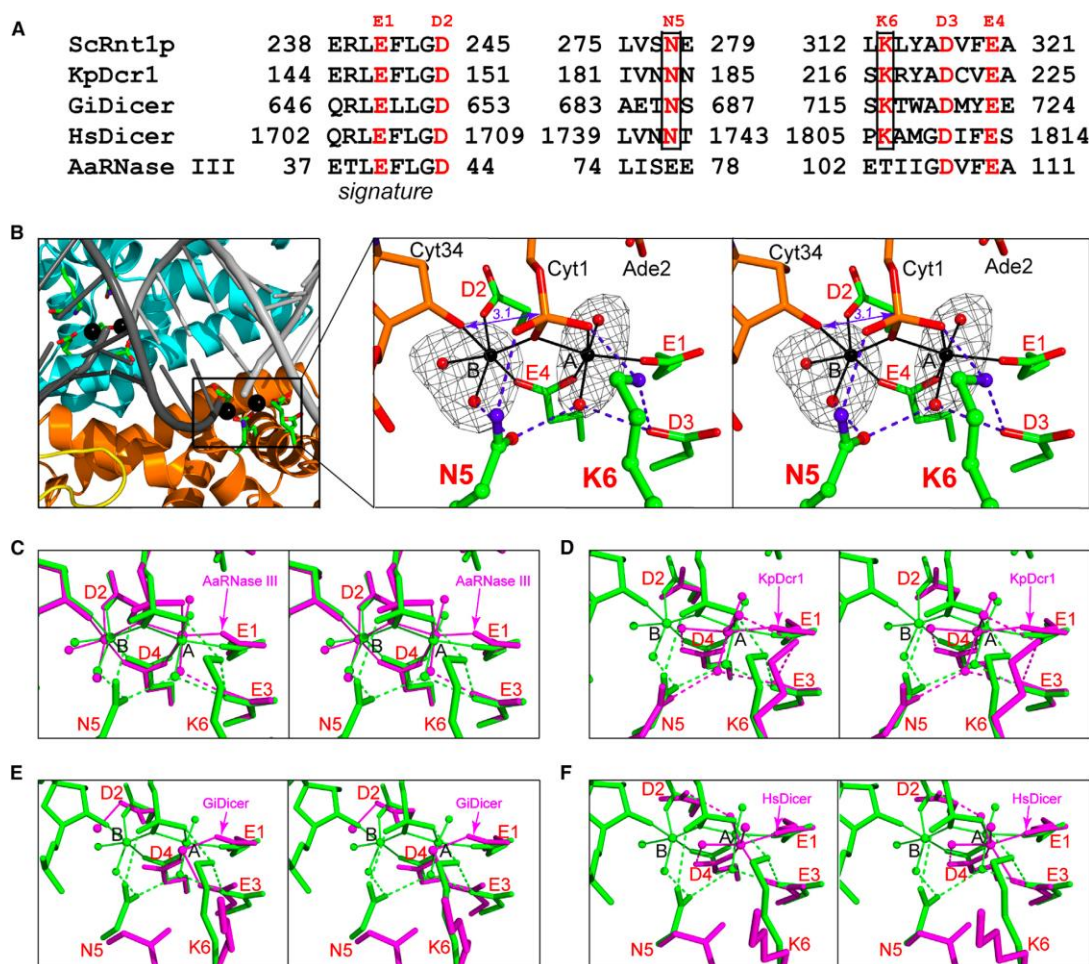


Figure 2: Cleavage Site Assembly of Eukaryotic RNase III

(A) Structure-based sequence alignment of ScRnt1p (this work), KpDcr1 (PDB entry 3RV0), GiDicer (PDB entry 2FFL), HsDicer (PDB entry 2EB1), and AaRNase III, (PDB entry 2NUG). The RIIID signature sequence is indicated and the conserved amino acid residues in the cleavage site highlighted (in red). The boxed residues, N5 and K6, are unique for eukaryotic enzymes. (B) The dsRNA-processing center of Rnt1p has two cleavage sites (left). Stereoview on the right shows the cleavage site assembly. Electron density (annealed omit Fo-Fc, contoured at 4.5 σ) is shown as grey nets for the Mg²⁺ ions (black spheres) and coordinating water molecules (red spheres). Residues are illustrated as sticks in atomic colors [N in blue, C in green (protein) or orange (RNA), O in red, P in orange, and Mg in black]. Mg²⁺ coordination is indicated by solid lines, hydrogen bonds by dashed lines, and the distance between the 3' hydroxyl oxygen of Cyt34 and the phosphorous of Cyt1 (3.1 Å) by a double-headed arrow. (C–F) Stereoviews show the superposition of the Rnt1p cleavage site assembly (in green) on that of AaRNase III (C), KpDcr1 (D), GiDicer (E), or HsDicer (F). The AaRNase III, KpDcr1, GiDicer, and HsDicer structures were adopted from the PDB as specified in (A) and shown in magenta. See also Figure S2.

1 **New RNA-Binding Motif Unique to Rnt1p**

2

3 Bacterial RNase III recognizes dsRNA with four RNA-binding motifs (RBMs), RBMs 1
4 and 2 in the dsRBD and RBMs 3 and 4 in the RIIID (Figure 3A, left). RBMs 1 and 3
5 form multiple hydrogen bonds with the O2' hydroxyl groups, while RBMs 2 and 4 each
6 projects a loop into the minor groove. These four RBMs are conserved in Rnt1p
7 (Figure 3A, right). Surprisingly, the Rnt1p:RNA structure revealed another RBM that
8 is specialized in the recognition of the conserved guanine in the G2-loop, which we
9 named RBM0 (Figure 3B). The RBM0 is formed by two additional α -helices (α 3, α 4)
10 near the C terminus of dsRBD (Figure 3C). The α 3 helix was also seen previously in
11 the structures of truncated dsRBD of Rnt1p in complex with RNA (Wang et al., 2011;
12 Wu et al., 2004), but α 4 was not observed before. These two helices transform the
13 conserved $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ fold of dsRBD (Ramos et al., 2000) into a new $\alpha\beta\beta\beta\alpha\alpha\alpha$ fold. Thus,
14 Rnt1p recognizes its substrate using five RBMs (0, 1, and 2 in dsRBD; 3 and 4 in
15 RIIID), corresponding to residues 445–455, 370–381, 392–399, 265–269, and 292–
16 312, respectively (Figure S2).

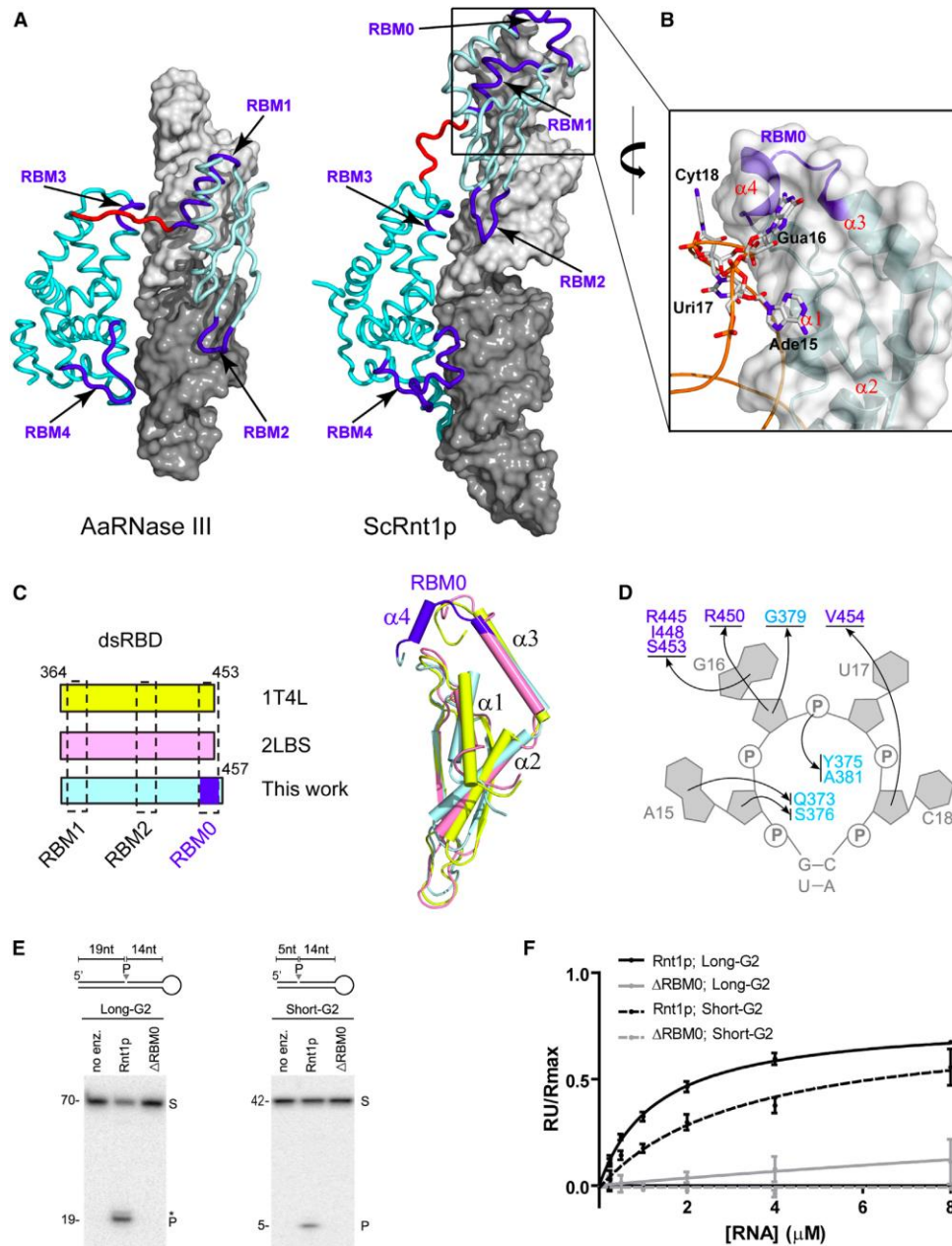


Figure 3: New RNA-Binding Motif, RBM0, Identifies the NGNN Tetraloop

(A) The arrangement of the RBMs of AaRNase III (PDB entry 2EZ6) is shown on the left and that of ScRnt1p (this work) on the right. Only one subunit of the protein dimer is shown. The RIID is shown in cyan and dsRBD in pale cyan. The RBMs are in blue and the linker between the two domains in red. Stem-loop RNA is shown as a molecular surface in grey or light grey. (B) RBM0 identifies the AGUC tetraloop. The dsRBD, outlined with a transparent molecular surface, is shown as a ribbon diagram with the RBM0 highlighted in blue. The RNA backbone is shown as a ribbon diagram with the four nucleotides in the tetraloop as sticks colored by atom (N in blue, O in red, C in grey, and P in orange).

(C) On the left, dsRBD proteins used in structural analysis (in cyan/blue, this work; in yellow, PDB entry 1T4L; in pink, PDB entry 2LBS) are illustrated with RBMs indicated with dashed boxes. On the right, the three dsRBD structures are superimposed. (D) Interaction map for the binding of RBMs 0 and 1 to the AGUC tetraloop via interaction(s) with the base, ribose, and/or backbone of the RNA. Residues of RBMs 0 and 1 are colored in blue and cyan, respectively. (E) RBM0 is required for substrate cleavage. The Long- or Short-G2 substrate was incubated alone (no enz), with recombinant Rnt1p (Rnt1p), or with enzymes lacking the RBM0 (Δ RBM0). The reactions were carried out in multiple turnover (substrate excess) and physiological salt (150 mM KCl) conditions. S and P indicate the position of intact substrate and cleavage product, respectively. The asterisk indicates a secondary cleavage product. The sizes of the different RNA fragments are indicated on the left. The substrates are illustrated on top. (F) RBM0 is required for substrate binding. Increasing amounts of Long- or Short-G2 were injected into surface-bound, full-length or Δ RBM0 enzyme. Shown is the binding curve from surface plasmon resonance. The ratio of the resonance unit change (RU) over the theoretical maximal RU (R_{max}) obtained for each binding assay is presented in the form of a graph. See also Figure S3 and Table S2.

Sequence-Specific Tetraloop Recognition by dsRBD

The Rnt1p:RNA structure showed that the dsRBD recognizes the AGUC tetraloop with RBMs 0 and 1 (Figure 3B). As summarized in Figure 3D, a total of 10 hydrogen bonds are formed between the tetraloop and residues in RBM0 (R445, I448, R450, S453, and V454) and RBM1 (Q373, Y375, S376, G379, and A381), demonstrating that the tetraloop is required for recognition. Four of the 10 hydrogen bonds are base-specific, including one between Ade15 and RBM1 residue Q373 (Figure S3A) and three between Gua16 and RBM0 residues R445, I448, and S453 (Figure S3B). In contrast, interactions of Uri17 with RBM1 (Figure S3C) and of Cyt18 with RBM0 (Figure S3D) are not base-specific. As illustrated in Figure S3E, Gua16 is the most conserved, Ade15 is less conserved, and Uri17 and Cyt18 are not conserved. It has been shown previously that Gua16 is essential for both binding and cleavage of G2 substrates, whereas mutations of the other three nucleotides reduce, but do not block, cleavage (Lamontagne et al., 2003; Lamontagne et al., 2004). Thus, the requirement of an

individual nucleotide in the tetraloop for cleavage appears to be dictated by its degree of base-specific interactions.

To evaluate the biochemical significance of RBM0, we prepared a truncated Rnt1p that lacks residues 446–471 (Δ RBM0). It was purified (Figures S1D, S1E) and tested for RNA binding and cleavage using G2 substrates with either long or short RNA duplex (Long- or Short-G2, Figure S1A) under multiple turn-over (RNA excess) and physiological salt (150 mM KCl) conditions. As shown in Figure 3E, Rnt1p was able to cleave both substrates efficiently while Δ RBM0 did not, indicating that RBM0 is required for Rnt1p function. To distinguish between defects in catalysis and RNA binding, we examined the impact of deleting the RBM0 on RNA binding in the absence of Mg²⁺ using surface plasmon resonance. As shown in Figure 3F, full-length Rnt1p efficiently bound to both G2 substrates whereas the Δ RBM0 did not bind the Short-G2 and bound very poorly to the Long-G2. The weak binding detected with the Long-G2 is consistent with specific role of RBM0 in recognizing the tetraloop and suggests that the other four RBMs may recognize the RNA duplex albeit inefficiently. We conclude that the RBM0 of Rnt1p is required for substrate binding and cleavage.

Clamp-Shaped Pocket Tailored for the Selection of Unpaired Guanosines

Inspection of the structure near the tetraloop revealed that the conserved guanosine (Gua16) is snugly positioned into a clamp-shaped pocket formed by one RBM1 residue (G379) and seven RBM0 residues (R445, A446, A447, I448, P449, R450, and S453), which we call G-clamp (Figure 4A). The G-clamp structure is tailored to the shape and chemical moieties of the protruding guanosine and as such it is responsible for the sequence requirement of Rnt1p substrates. Moreover, side-by-side comparison of the Rnt1p:RNA^{AGUC-capped} structure (this work) with the

1 dsRBD:RNA^{AGAA-capped} structure (Wu et al., 2004) shows distinct locations of the
2 guanine base in the tetraloop (Figures S4A, S4B). Therefore, the G-clamp not only
3 recognizes the guanosine in the second position of the loop but also reshapes the
4 loop to better fit the enzyme structure.

5
6 To evaluate the effect of the G-clamp structure on substrate selection, we substituted
7 the Gua16 base with either adenine or 2-aminopurine, which eliminates its specific
8 interaction with R445 (Figure 4B). The impact on protein binding was then tested using
9 the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Rnt1p bound efficiently the
10 unmodified RNA but not the RNAs with modified bases in that position. This suggests
11 that other interactions, like those observed with Y46 or those with I448 and S453, are
12 not sufficient for efficient binding to the RNA. To more clearly evaluate the relative
13 contribution of G-clamp residues that directly interact with Gua16 to the enzyme
14 function, we replaced residues R445, P449, R450, and S453 individually with alanine
15 or lysine and tested the impact on RNA binding and cleavage (Figures 4C and 4D).
16 The substitution of R445 blocked the cleavage and binding of both G2 substrates. In
17 contrast, the substitution of P449, R450, or S453 did not block but reduced the binding
18 and cleavage of the two substrates. As expected, the binding to Short-G2, which limits
19 interactions between the enzyme and the RNA beyond the cleavage site, was more
20 affected by the G-clamp mutations than the binding to Long-G2 (Figure 4D). However,
21 the cleavage of Short-G2 was not more affected than the cleavage of Long-G2 by
22 these mutations (Figure 4C), suggesting that enzyme-RNA interactions beyond the
23 cleavage site do not directly contribute to cleavage efficiency. The R445 requirement
24 for cleavage can be explained by its side chain stacking with the Gua16 base, the
25 formation of a hydrogen bond with the Gua16 base, and the formation of a hydrogen
26 bond with the G379 carbonyl that forms a hydrogen bond with the Gua16 O2'-OH
27 (Figure 4A). We conclude that residue R445 is required for substrate binding and
28 cleavage, while the intact structure of the G-clamp is necessary for optimal affinity and
29 activity.

1

2 Residue Q373 forms a single base-specific hydrogen bond with Ade15, the first
3 nucleotide in the tetraloop (Figure S3A), and the Q373A mutation had similar effects
4 as the P449A, R450A, or S453K mutation that did not block but reduced the cleavage
5 of the two G2 substrates (Figures S3F, 4C).

6

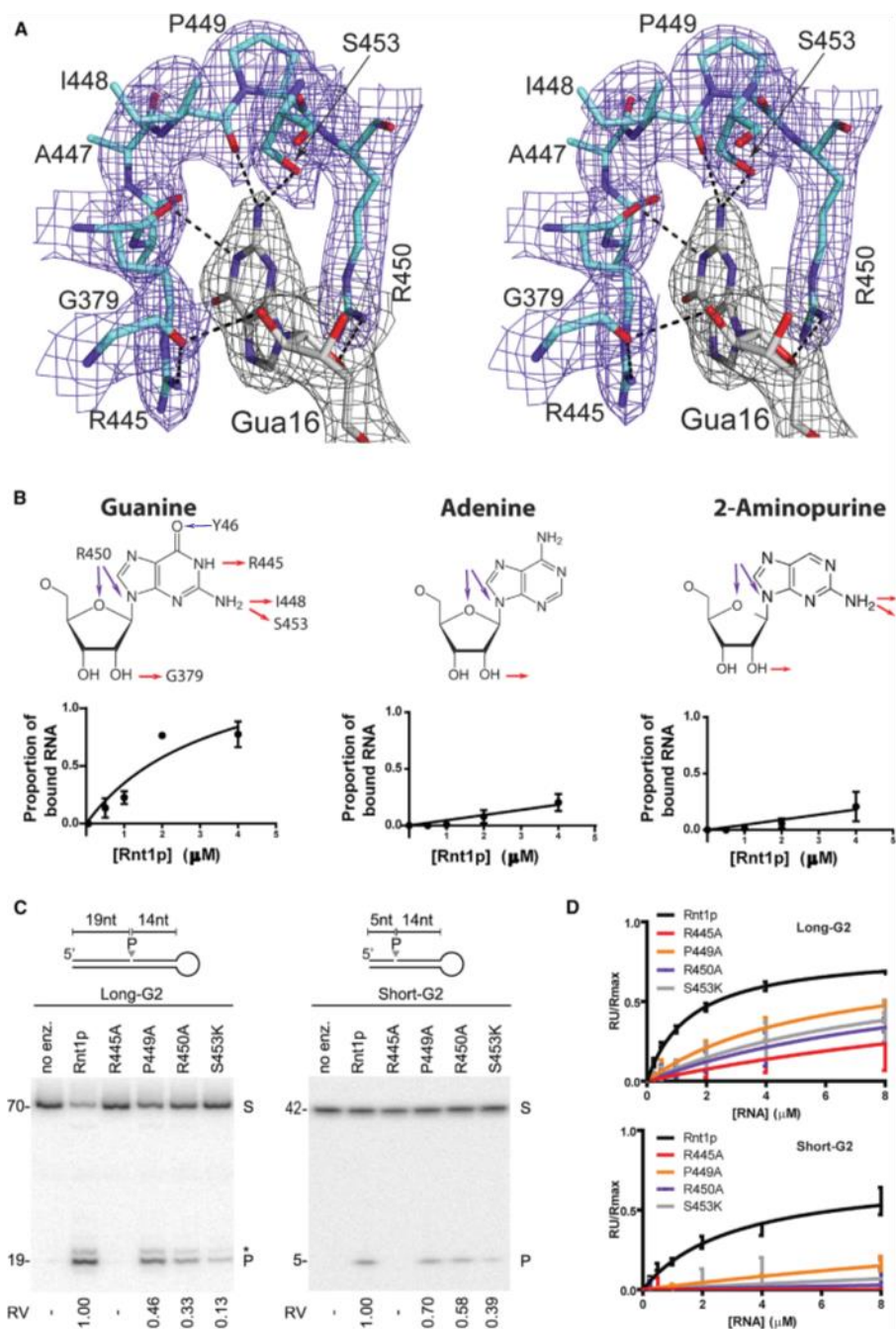


Figure 4: G-clamp Is Tailored for the Recognition of Gua16

(A) Stereoview showing that the conserved Gua16 base is buried in the G-clamp formed by eight residues from RMBs 0 and 1. Residues are illustrated as sticks [N in blue, O in red, P in orange, and C in pale cyan (amino acids) or grey (nucleotide)] outlined with electron density

map (blue/grey nets, 2Fo-Fc, contoured at 1.2 σ). Dashed lines indicate hydrogen bonds. (B) Guanine-specificity of the G-clamp. Rnt1p substrates carrying adenine or 2-aminopurine in the second position of the NGNN loop were tested for binding to Rnt1p using electrophoretic mobility gel shift assay (EMSA). The top panels show the structure of the three bases; hydrogen bonds formed between each base and the G-clamp are indicated by red and blue arrows. The bottom panels show the binding curves of the three substrates derived from gel shift assays. (C) Contribution of G-clamp residues to RNA cleavage. Four G-clamp residues directly interacting with Gua16 of the tetraloop were individually mutated and the impact on enzyme activities was tested using Long- or Short-G2 as described in Figure 3E. Relative velocities (RV), the cleavage rates obtained with the mutants relative to that obtained by the wild type, are indicated at bottom. (D) Impact of G-clamp mutations on substrate binding. The binding kinetics of different mutations to Long- or Short-G2 were assessed using surface plasmon resonance and the ratio of the resonance unit (RU) over the theoretical maximal RU (Rmax) obtained for each binding assay is presented in the form of a graph. See also Figure S4 and Tables S1 and S2.

Rnt1p Interacts with the RNA Stem Upstream of the Cleavage Sites

The conserved RBMs of Rnt1p (RMBs 1–4, Figure S2) interact with the first five base pairs, the 9th base pair, and the scissile bond downstream of the tetraloop, demonstrating that the structural basis for recognizing dsRNA is conserved between bacterial and yeast enzymes. The Rnt1p:RNA structure shows that RBM1 interacts with base pairs 1–4, the α 2 helix of the dsRBD interacts with base pair 5 (Figure 5A), RBMs 2 and 4 interact with base pair 9 (Figure 5B), and RBM3 recognizes the scissile bond (not shown). Therefore, using RBMs 0–2 and the α 2 helix the Rnt1p dsRBD interacts with the tetraloop (Figure 3D) and the RNA stem (Figures 5A, 5B) by forming a total of 18 hydrogen bonds to the RNA, confirming that the role of dsRBD in substrate recognition is conserved in Rnt1p. Seventeen out of the 18 are directed at the tetraloop and its neighboring five base pairs (Figures 3D, 5C), which explains why Rnt1p can bind to a short RNA hairpin with a 5-base pair stem (Lamontagne et al., 2003), a substrate much shorter than what bacterial enzyme can (Gan et al., 2006).

1 To determine the significance of the interaction between RBM2 and the 9th nucleotide,
2 which is located midway between the upper stem-loop and cleavage site, we mutated
3 the interacting amino acid K392 and tested the effect on RNA binding and cleavage.
4 Comparison of the cleavage kinetic parameters of the wild type and the K392A mutant
5 indicated that the mutation did not affect the binding of Long-G2 but reduced the
6 amount of cleaved RNA by ~35% (Figures 5D, 5E). Consistently, analysis of the
7 kinetic parameters of the Long-G2 cleavage indicated slower catalysis and decreased
8 catalytic efficiency with little effect on the K_M (Table S1). Similarly, the K392A mutation
9 impaired the cleavage of the Short-G2 substrates. However, unlike Long-G2, binding
10 to Short-G2 was significantly inhibited by the K392A mutation (Table S1). This result
11 is consistent with previous studies suggesting that the 9th base pair is important for
12 Rnt1p binding (Lamontagne et al., 2003). We conclude that the interaction of Rnt1p
13 with the middle of the RNA stem is required for optimal binding and cleavage and is
14 particularly critical for forming stable complexes with short RNA substrates.

15

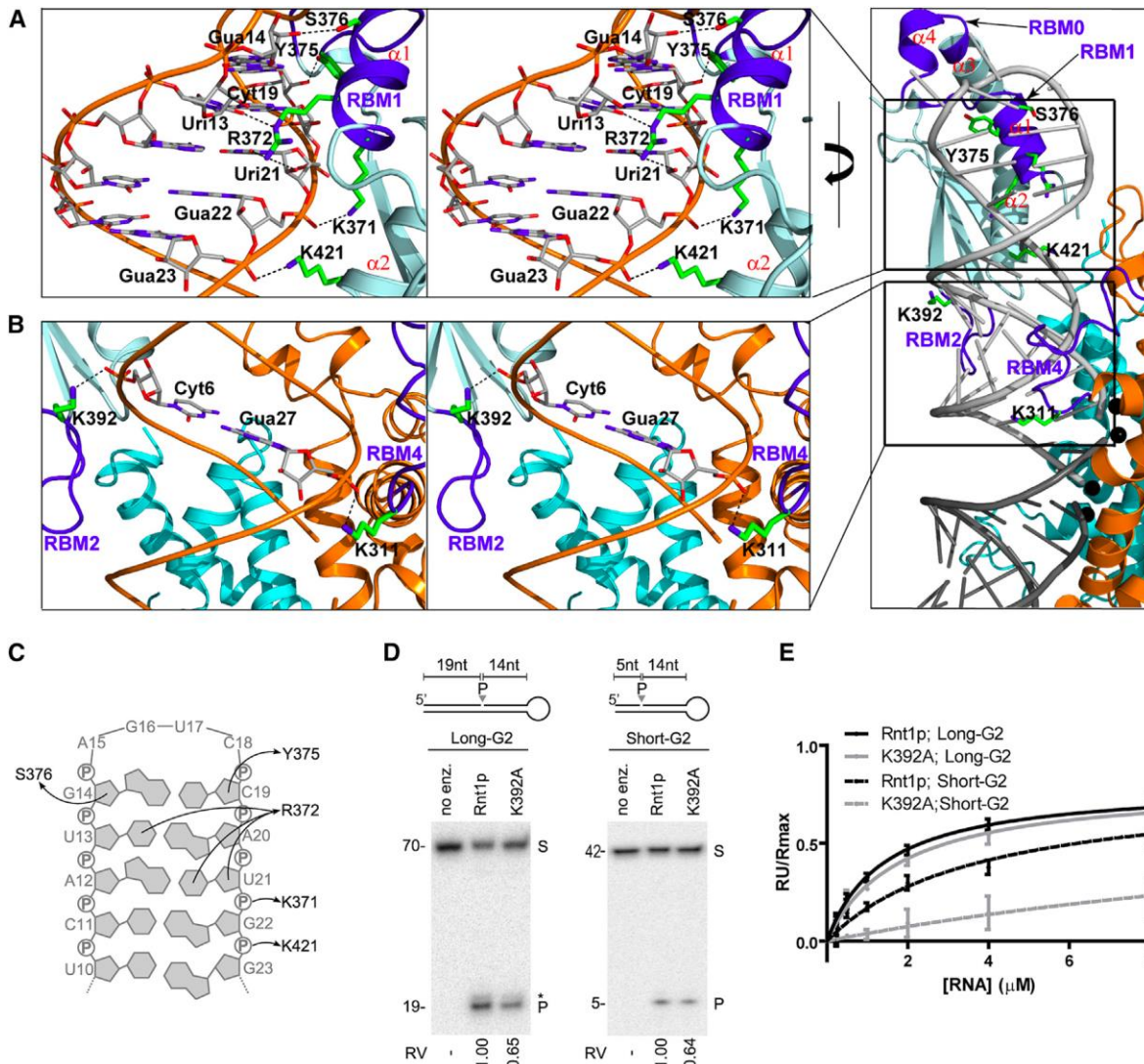


Figure 5: dsRBD Interacts with the Stem down to the 9th Base Pair below the Tetraloop

(A) Stereoview showing the interactions between RBM1 and the first four base pairs below the tetraloop and that between the $\alpha 2$ K421 and the 5th base pair. Residues are shown as sticks in atomic colors [N in blue, C in green (protein) or grey (RNA), O in red, and P in orange]. Dashed lines indicate hydrogen bonds. A "zoomed out" view indicating the position of the RBMs within the Rnt1p:RNA structure is shown on the right. (B) Stereoview showing the interactions between the 9th base pair below the tetraloop and residues K392 from RBM2 and K311 from RBM4. (C) Interaction map between the Rnt1p dsRBD and the first five base pairs below the tetraloop. (D and E) Disruption of RBM2 interaction with the 9th base pair below the tetraloop alters RNA binding and cleavage. Residue K392 was mutated and the impact of the mutation was tested on substrate cleavage and binding as described in Figures 4C and 4D. See also Tables S1 and S2.

Interaction between the NTD and RNA Increases Precision of Cleavage Site Selection

Deletion of the Rnt1p NTD impairs cleavage at high salt conditions, which was suggested to contribute to the stability of the protein-RNA complex (Lamontagne et al., 2000; Lavoie and Abou Elela, 2008). However, the mechanism by which the NTD contributes to substrate selection and catalysis remained unclear. As shown in Figure 6A, the NTD has an all-helical fold that forms an intertwined dimer, as was shown for *Kluyveromyces polysporus* Dcr1 (KpDcr1, Weinberg et al., 2011). Surprisingly, however, the NTD dimer was found in contact with the AGUC tetraloop via four hydrogen bonds between four amino acid residues (Y46 and H54 from one subunit, K58 and H54 from the other) and three nucleotide residues (Gua14, Ade15, and Gua16). Residue Y46 forms a base-specific hydrogen bond with Gua16. In addition, one of the two H54 side chain stacks with the Ade15 base. This set of NTD-tetraloop interactions has also been observed in two other crystal forms (data not shown), indicating that this arrangement is highly preferred. As Ade15 and Gua16 are conserved in G2-loops (Figure S3E), this finding suggests that the NTD directly contributes to substrate selection. To test this possibility, we examined the impact of deleting the NTD on cleavage when compared to the wild type and the RBM0 deletion. Cleavage reactions were performed first under low salt conditions (10 mM KCl) with excess protein to allow the detection of any residual activity. As shown in Figures 6B and 6C, wild-type enzyme cleaved the two G2 substrates almost to completion, whereas both the Δ NTD and Δ RBM0 showed reduced cleavage. Furthermore, the deletion of NTD resulted in the appearance of additional cleavage products, corresponding to the cleavage at non-canonical sites, 5–8 nucleotides below the tetraloop. Interestingly, the Short-G2 showed reduced binding with both the wild type and Δ NTD relative to the Long-G2 (Table S1). Consistent results were obtained when the cleavage reactions were carried out under either the low salt but multiple turnover conditions or the crystallization conditions (data not shown). We conclude that the

1 Rnt1p NTD increases the precision of the cleavage site selectivity by directly
2 interacting with Gua16 and the 5' end region of the G2-loop.

3

4 The structural and functional data suggest that two rulers are dedicated for the
5 mechanism of Rnt1p action: Ruler 1 is the RIID1-dsRBD1 fragment; Ruler 2 is the
6 RIID2:NTD1/NTD2 complex (Figure 6D). Upon the Rnt1p:RNA complex formation,
7 both rulers are sufficiently "stiff" owing to the protein-protein (RIID1–RIID2, RIID1-
8 dsRBD1, RIID2-NTD1/NTD2, and dsRBD1-NTD1/NTD2) and protein-RNA
9 interactions. Both rulers interact with the NGNN tetraloop; Ruler 1 recognizes the
10 Gua16 base and Ruler 2 secures the Gua16 recognition. Hence, the two RNA strands
11 of the substrate are cleaved accurately 14 and 16 nucleotides, respectively,
12 downstream from the tetraloop.

13

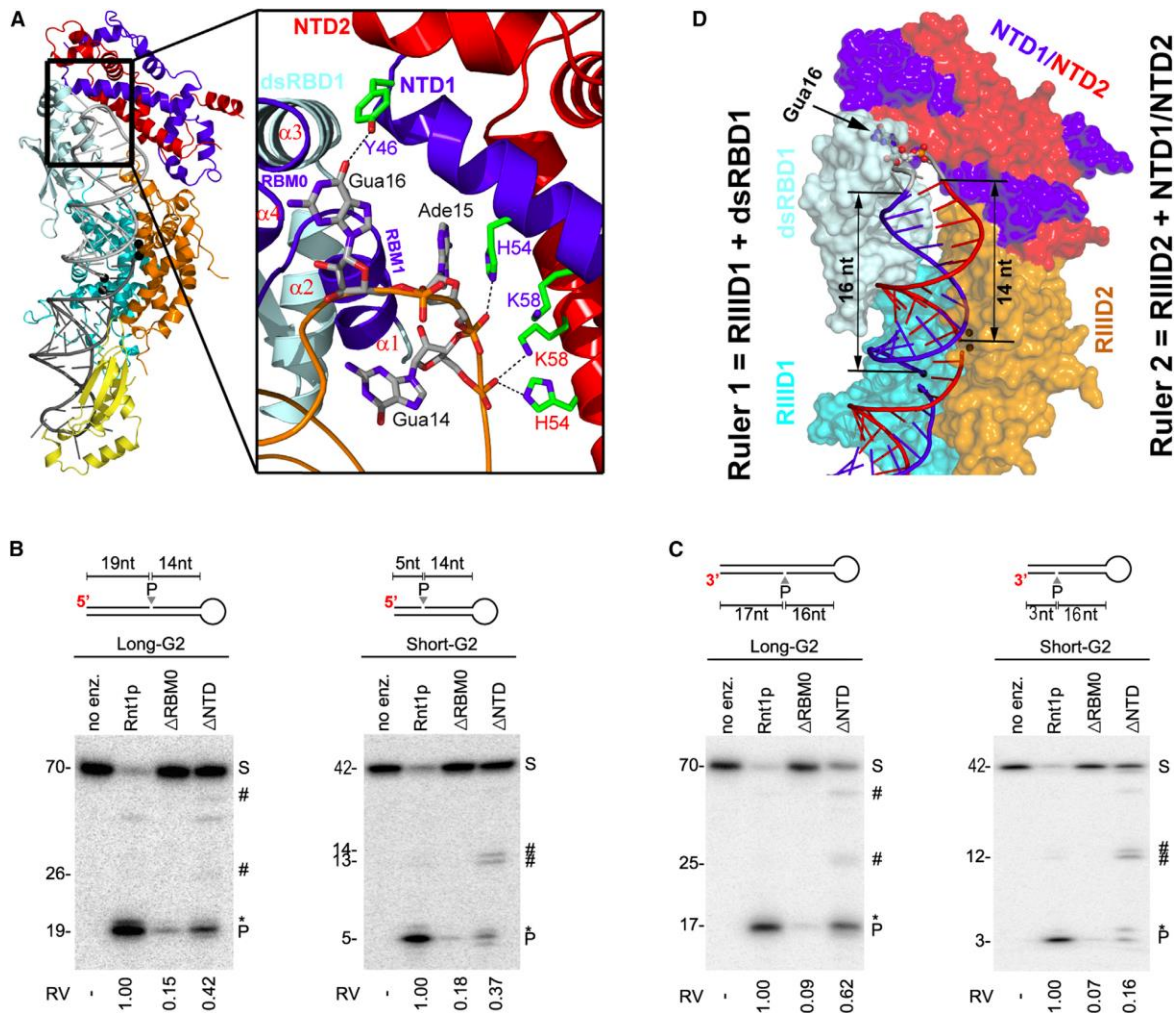


Figure 6: NTD Dimer Interacts with RNA to Increase Binding Affinity and the Precision of Cleavage Site Selection

(A) The NTD dimer of Rnt1p interacts with three nucleotides within or near the AGUC tetraloop. NTD1 (blue) and NTD2 (red) are shown as ribbons. RNA backbone is shown in orange. Contacting residues are shown as sticks. Dashed lines indicate hydrogen bonds. (B, C) Deletion of the NTD impairs cleavage site selection of G2 substrates. The substrates were labeled at their 5' (B) or 3' (C) ends. Wild-type enzyme (Rnt1p), enzyme lacking the RBM0 (ΔRBM0), or that lacking the NTD (ΔNTD) were incubated with either Long- or Short-G2 and the cleavage products visualized under single turnover (enzyme excess) and low salt (10 mM KCl) conditions. Alternative cleavage sites observed in the absence of the NTD are indicated by "#". The cleavage rates are indicated as relative velocities (RV) at bottom. (D) The double-ruler architecture ensures the cleavage accuracy. The protein is illustrated as a molecular surface and color-coded as in (A). The RNA is shown as a cartoon in grey for the tetraloop and in blue and red for the stem. Gua16 is highlighted as a ball-and-stick illustration. See also Figure S5 and Tables S1 and S2.

DISCUSSION

The majority of RNase III natural substrates are short RNA molecules with specific features located at a fixed distance from the scissile bonds, such as the 3' overhang and internal or terminal loops (Nicholson, 2003). In this study, we reveal a mechanism by which a eukaryotic RNase III recognizes a terminal tetraloop sequence in harmony with the formation of the catalytic complex. Recognition of the tetraloop is achieved by an extended dsRBD with two additional α -helices, $\alpha 3$ and $\alpha 4$. This $\alpha\beta\beta\beta\alpha\alpha$ fold of the dsRBD creates a unique guanosine-specific binding motif that we call the G-clamp. Surprisingly, the Rnt1p:RNA structure also revealed specific contacts between the NTD dimer and the 5' end region of the tetraloop. Deletion of the NTD led to cleavage at alternative site(s), suggesting that this motif increases the precision of the cleavage site selectivity. Together, the work presented here demonstrates a new mechanism for RNase III substrate selectivity whereby the dsRBD and the NTD dimer jointly bind the tetraloop and position the RIIID dimer along the stem at a fixed distance from the tetraloop.

Eukaryotic RNase IIIs feature an NTE of variable lengths and domain structures (Figure 1A). Yeast Rnt1p is an excellent model system for studying such NTEs. It contains a single NTD, but the linker between the NTD and RIIID (residues 155–190) is 46-residues long (Figure S2). Secondary structure and disorder prediction suggests that this linker is disordered and thus flexible. On one hand, the degradation of Rnt1p into the NTD and Δ NTD fragments is, at least in part, due to the length and flexibility of this linker. On the other hand, it is this long and flexible linker that could allow the NTD dimer to reach and interact with the dsRBD and the AGUC tetraloop. It is not clear, however, which NTD within the NTD dimer is connected to which RIIID in the RIIID dimer. We believe that the intact Rnt1p protein could form the same complex because this complex is in excellent agreement with previous studies, which indicated

1 that the NTD of Rnt1p could interact with itself and the dsRBD (Lamontagne et al.,
2 2000) while contacting the 5' side of the tetraloop (Lavoie and Abou Elela, 2008).
3 Whether the NTD and dsRBD from the same Rnt1p are involved in the recognition of
4 Gua16 in the AGNN tetraloop remains to be seen.

5
6 The Rnt1p:RNA structure explains the capacity of Rnt1p to play a general role in RNA
7 processing and regulation in yeast despite its high specificity to a given RNA structure.
8 With just one exception, the natural substrates of Rnt1p contain the guanine
9 nucleotide in the second position of the tetraloop (Jules Gagnon, Mathieu Lavoie, and
10 Sherif Abou Elela, unpublished data). Therefore, the structural basis for the
11 processing of all but one natural substrates of Rnt1p has been provided by the new
12 structure. The one substrate RNA that is not capped with the G2-loop (snR48)
13 contains an adenine nucleotide in the second position (the AAGU tetraloop), for which
14 the binding mode by the enzyme remains to be revealed.

16 **The Presence of NTD Increases the Accuracy and Efficiency of Yeast RNase III**

17
18 Eukaryotic RNase IIIs each contains an NTE that includes the helicase, DUF283 and
19 PAZ domains in Dicer, the P-rich and RS-rich domains in Drosha, or the NTD in
20 KpDcr1 and Rnt1p (Figure 1A). These domains could specifically interact with RNA
21 and influence cleavage in different ways. It has been suggested that Dicer uses the
22 PAZ domain to recognize the end of dsRNA substrate (Zhang et al., 2004) and uses
23 the helicase domain to recognize the loop/bulge structure of short hairpin RNAs for
24 accurate processing (Gu et al., 2012). The Rnt1p:RNA structure demonstrates that
25 the NTD is a well-defined structural domain that exhibits an all-helical fold and forms
26 an intertwined dimer (Figure 1B), which is similar to that of the KpDcr1 (Weinberg et
27 al., 2011). However, unlike the KpDcr1 NTD dimer, which stacks on the back of its

1 RIIID dimer, the Rnt1p NTD extends away (Figure S5A). On one hand, the length of
2 the linker connecting the NTD to RIIID in KpDcr1 is too short to permit the extended
3 NTD-RIIID arrangement as observed in Rnt1p (Figure S2 and S5A). On the other
4 hand, the Rnt1p NTD dimer may not adopt a KpDcr1-like position because the
5 electrostatic potential between the corresponding surfaces of the NTD and the RIIID is
6 not compatible (Figure S5C). The distinct orientations of Rnt1p and KpDcr1 domains
7 reflect the difference between the enzymes' modes of substrate selection. In the case
8 of Rnt1p, the enzyme extends to recognize the terminal tetraloop with both the NTD
9 and the dsRBD, whereas in the case of KpDcr1, neither the NTD nor the dsRBD are
10 positioned to measure the length from the end of a dsRNA molecule to the cleavage
11 sites (Weinberg et al., 2011).

12
13 The Rnt1p:RNA structure indicates a direct role of the NTD dimer in substrate
14 selection. This mode of substrate recognition, in which the NTD assists in selecting
15 the cleavage site at a given distance, is not possible in bacterial RNase III because it
16 lacks an NTE. During evolution, however, eukaryotic RNase IIIs have acquired an
17 NTE to enhance the basic dsRNA substrate specificity conferred by the dsRBD.

18 19 **How Does Eukaryotic RNase III Process dsRNA?**

20
21 Despite the wealth of information on the function of eukaryotic RNase III enzymes, the
22 biochemistry of these enzymes remains obscure (Li et al., 2010; MacRae and Doudna,
23 2007). The Rnt1p:RNA structure represents the catalytic state immediately after
24 cleavage, and as such, provides a unique opportunity to look at how the eukaryotic
25 RIIID dimer cleaves dsRNA. The dimerization of RIIID creates the catalytic valley in
26 which the two cleavage sites form the processing center. Each strand of the bound
27 RNA aligns at a cleavage site and the two sites are spaced such that the cleavage of

1 the two stands creates the 2-nt 3' overhangs on the product ends (Figure 2). Each
2 cleavage site requires six conserved amino acids side chains, among which the
3 general organization of E1, D2, D3, and E4 is preserved from bacteria to human,
4 whereas the involvement of N5 and K6 is unique for eukaryotes. In the Rnt1p:RNA
5 structure, the N5 and K6 side chains interact with the 5' phosphate group of the
6 cleaved scissile bond, showing how they are directly involved in the formation of the
7 cleavage site assembly of eukaryotic RNase IIIs. We hypothesize that these two
8 residues participate in the stabilization of the transition state during catalysis.

9 10 **The Rnt1p dsRBD Exhibits a New Mode of Sequence-Specific Selection of** 11 **dsRNA**

12
13 The classical mode of dsRNA recognition involves interactions between the dsRBD
14 and two minor grooves of dsRNA in order to discriminate between RNA and DNA
15 duplexes. These interactions do not contribute directly to cleavage site selection but
16 instead increase substrate affinity. As such, *E. coli* RNase III can accurately cleave
17 double stranded RNA after the deletion of its dsRBD (Sun et al., 2001); *Giardia*
18 *intestinalis* Dicer (GiDicer, MacRae et al., 2006) and *Bacillus subtilis* Mini-III (BsMini-
19 III, Redko et al., 2008) do not even have a dsRBD (Figure 1A). In contrast, the dsRBD
20 of Rnt1p was shown to be required for the recognition of dsRNA capped with NGNN
21 tetraloop (Nagel and Ares, 2000). However, the basis of this substrate selectivity
22 remained unclear, because previous structures using truncated dsRBD did not show
23 that the Gua16 in the tetraloop is specifically recognized by the new structural motif
24 we termed the G-clamp. The G-clamp structure is formed by seven RBM0 and one
25 RBM1 residues, resulting in perfect shape complementarity and base-specific
26 hydrogen bonds (Figure 4). The discovery of this G-specific motif illustrates how the
27 dsRBD may acquire affinity to RNA with specific motif and opens the door for

1 designing other clamp structures capable of targeting RNAs harboring different
2 tetraloop sequences and broaden the substrate specificity of RNase III.

3
4 The 7-residue flexible linker between the RIIID and dsRBD of AaRNase III (Figure S2)
5 allows substantial conformational changes between the two domains, suggesting that
6 RNase III first binds its substrate using one dsRBD, and by free rotation of the RNA-
7 bound dsRBD with respect to the RIIID dimer subsequently brings the RNA in
8 alignment with the catalytic valley for cleavage (Gan et al., 2005). Similarly, the dsRBD
9 of Rnt1p may also perform the initial recognition of the substrate using RBM0, leading
10 to further binding to the stem through interactions with RBMs 1–4. Indeed, in the
11 absence of Mg²⁺, Rnt1p formed a stable complex with RNA in a dsRBD-dependent
12 manner (Lavoie and Abou Elela, 2008).

14 **The Double-Ruler Mechanism for Substrate Selection**

15
16 Soon after the discovery of bacterial RNase III, it was noted that the cleavage products
17 of long dsRNAs by this enzyme are of similar size, giving rise to the idea that the
18 enzyme acts as a molecular ruler measuring the number of nucleotides from one end
19 to its cleavage site (Court, 1993; Nicholson, 1999). However, it was Rnt1p that
20 provided the first concrete example of cleavage at a fixed distance from a specific
21 RNA structure, namely the NGNN tetraloop (Chanfreau et al., 2000). This pattern of
22 cleavage is induced by a combination of structural and base-specific interactions with
23 the stem-loop as summarized in Figure 7A. The Rnt1p:RNA structure shows that the
24 initial binding and positioning box (IBPB), which consists of the conserved NGNN
25 tetraloop, is recognized by RBMs 0 and 1 as well as the NTD dimer, the binding
26 stability box (BSB) is recognized by RBM1 and the α 2 helix of dsRBD, and the
27 cleavage efficiency box (CEB) is recognized by RBM3. In addition to these established

1 RNA epitopes (Lamontagne et al., 2003), the structure also identifies the middle box
2 (MB) as a site for the interaction of RBMs 2 and 4 with the 9th base pair below the
3 tetraloop. We conclude that the MB is required for stabilizing the protein:RNA
4 complex, especially when the substrate is too short to allow all the RBMs of both
5 subunits to contact the RNA.
6

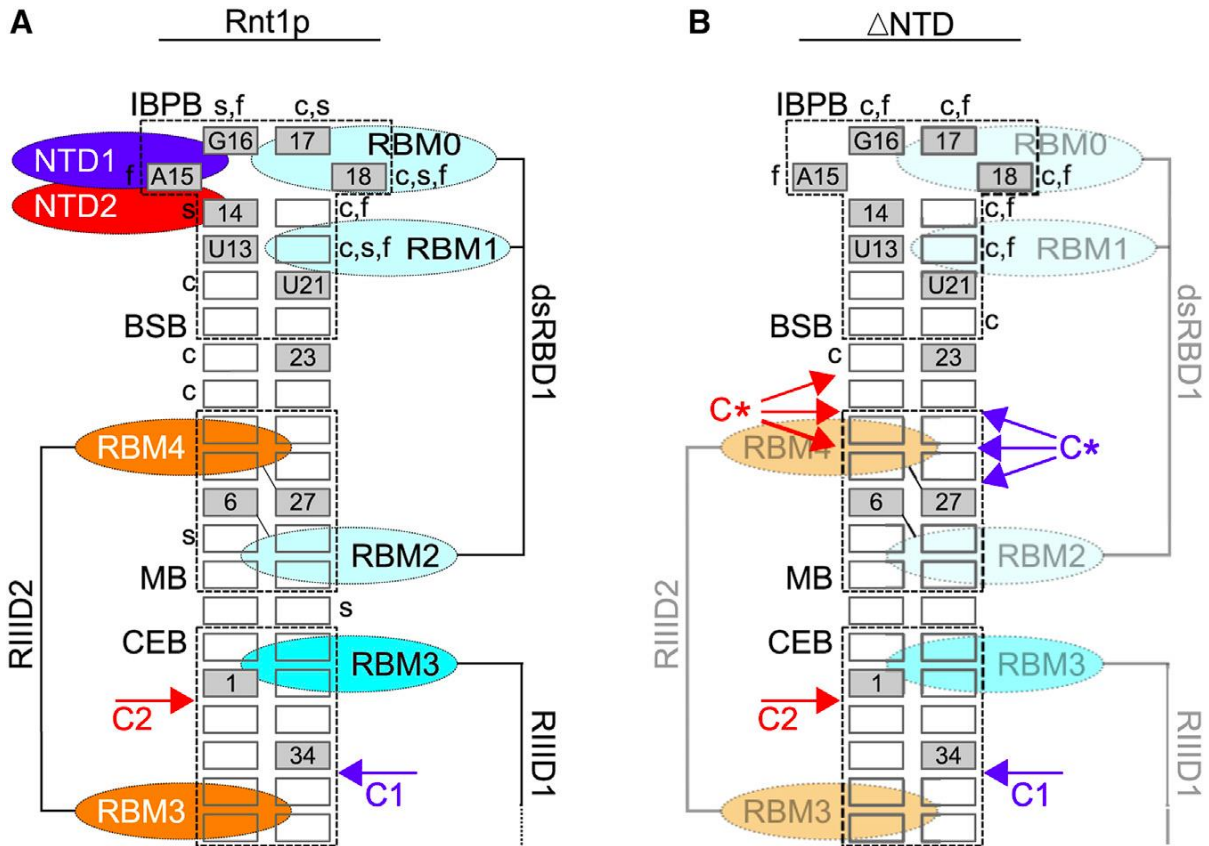


Figure 7: Double-Ruler Mechanism for Substrate Selection by Rnt1p

(A) Schematic representation of Rnt1p interactions with G2 substrates. Nucleotides are shown as rectangles, while RBMs and NTDs as ellipsoids. C1 and C2 indicate the two canonical cleavage sites. The four boxes of the RNA substrate are outlined with dashed lines. Sites of hydrogen bonds formed between proteins and RNA backbone are shown as shaded rectangles and labeled with residue numbers only, whereas nucleotides forming base-specific hydrogen bonds are labeled by both one-letter code and residue number. Lowercase letters c, f, and s indicate, respectively, positions of chemical interference (Ghazal and Elela, 2006), hydrogen bonds requirement for cleavage (Lavoie and Abou Elela, 2008), and sites where hydrogen bonds were observed with the ribose 2'-OH in the dsRBD:RNA structure (PDB entry 1T4L). (B) Schematic representation of the Δ NTD interactions with the G2 substrates. C1 and C2 indicate the two canonical cleavage sites by Rnt1p. C* signifies additional cleavage sites produced by the Δ NTD.

1 Together, the structural and functional information suggests a new mechanism of
2 substrate recognition, the double-ruler mechanism, which uses the NTD dimer as a
3 second ruler to ensure the precision of cleavage (Figure 6D). The additional cleavage
4 sites on the G2 substrates observed in the in vitro cleavage reaction catalyzed by
5 Δ NTD (Figures 6B and 6C) are summarized in Figure 7B. This unusual double-ruler
6 mechanism for substrate selection represents an example of molecular ruler evolution
7 and provides a framework for understanding the mechanism of eukaryotic RNase III
8 action.

10 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

12 **Crystal Structure Determination**

14 The Rnt1p:RNA complex was made by incubation prior to crystallization. Initial
15 screening for crystallization conditions was carried out with a Hydra II Plus One robot
16 system (Matrix Technologies Corporation). X-ray diffraction data were collected at the
17 SER-CAT 22-ID beamline of the Advanced Photon Source and processed using
18 program XDS (Kabsch, 2010). The structure was solved by molecular replacement
19 (MR) and difference Fourier synthesis. X-ray data and structure refinement statistics
20 are listed in Table 1. The MR search was very difficult due to protein degradation. For
21 details, see Supplemental Experimental Procedures.

23 **In vitro Cleavage Assays**

25 In vitro cleavage reactions were conducted as described (Lavoie and Abou Elela,
26 2008). For a brief description, see Supplemental Experimental Procedures.

1

2 **Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)**

3

4 EMSA assays were performed as described (Lamontagne et al., 2001) with less than
5 10 fmols of radiolabeled RNA and Rnt1p concentrations ranging from 500 to 4000 nM.
6 Kd values were calculated using a single binding site non-linear regression model.
7 The experiment was repeated three times.

8

9 **Surface Plasmon Resonance**

10

11 RNA binding over Rnt1p was monitored using the T200 Biacore system (GE
12 healthcare life sciences, Baie d'Urfe Quebec, Canada) in 30 mM HEPES (pH 7.5),
13 150 mM KCl, and 10 nM EDTA. Different versions of His-tagged Rnt1p (Lamontagne
14 et al., 2001) were immobilized on Nickel-NTA chip via the His-tag prior to RNA
15 injection. The surface was washed with 350 mM EDTA and 0.1% SDS between each
16 sample. Steady state levels of binding were calculated relative to the amount of protein
17 bound to the chip for each RNA concentration to generate RU/Rmax values. The
18 experiment was repeated three times. Kd values were calculated using a single
19 binding site non-linear regression model and presented in Table S1.

20

21 **Acknowledgments**

22

23 We thank Catherine Desrosiers for help with protein purification, Jules Gagnon for
24 tetraloop sequence conservation analysis, and Donald Court, George Mackie, and
25 Alexander Wlodawer for discussion. X-ray diffraction data were collected at the SER-

1 CAT 22-ID beamline of the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory.
2 This research was supported by the Intramural Research Program of the NIH, National
3 Cancer Institute, Center for Cancer Research (X.J.) and a grant from the Canadian
4 Institute of Health Research (S.A.E.).

5

6 **ACCESSION NUMBER**

7 Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data
8 Bank (PDB) under entry code 4OOG

9

1 REFERENCES

- 2 1. Abou Elela, S., and Ares, M., Jr. (1998). Depletion of yeast RNase III blocks
3 correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2
4 snRNA. *EMBO J.* 17, 3738-3746.
- 5 2. Abou Elela, S., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996). RNase III cleaves eukaryotic
6 preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115-124.
- 7 3. Catala, M., Tremblay, M., Samson, E., Conconi, A., and Abou Elela, S. (2008).
8 Deletion of Rnt1p alters the proportion of open versus closed rRNA gene
9 repeats in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 28, 619-629.
- 10 4. Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000). Recognition of a conserved
11 class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc. Natl.*
12 *Acad. Sci. USA* 97, 3142-3147.
- 13 5. Chanfreau, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998). Yeast RNase III as a key
14 processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* 284, 975-
15 988.
- 16 6. Court, D. L. (1993). RNA processing and degradation by RNase III, In Control
17 of Messenger RNA Stability, J. G. Belasco, and G. Brawerman, eds. (New
18 York: Academic Press), pp. 71-116.
- 19 7. Court, D. L., Gan, J., Liang, Y.-H., Shaw, G. X., Tropea, J. E., Costantino, N.,
20 Waugh, D. S., and Ji, X. (2013). RNase III: Genetics and Function; Structure
21 and Mechanism. *Annu. Rev. Genet.* 47, 405-431.
- 22 8. Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., and Chanfreau, G. (2003). RNase III-
23 mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol. Cell* 11,
24 1279-1289.
- 25 9. Du, Z., Lee, J. K., Tijhen, R., Stroud, R. M., and James, T. L. (2008). Structural
26 and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: A
27 conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
28 105, 2391-2396.

10. Gan, J., Shaw, G., Tropea, J. E., Waugh, D. S., Court, D. L., and Ji, X. (2008). A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Mol. Microbiol.* 67, 143-154.
11. Gan, J., Tropea, J. E., Austin, B. P., Court, D. L., Waugh, D. S., and Ji, X. (2005). Intermediate states of ribonuclease III in complex with double-stranded RNA. *Structure (Camb)* 13, 1435- 1442.
12. Gan, J., Tropea, J. E., Austin, B. P., Court, D. L., Waugh, D. S., and Ji, X. (2006). Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell* 124, 355-366.
13. Ghazal, G., and Elela, S. A. (2006). Characterization of the reactivity determinants of a novel hairpin substrate of yeast RNase III. *J. Mol. Biol.* 363, 332-344.
14. Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P. N., and Kay, M. A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* 151, 900-911.
15. Hartman, E., Wang, Z., Zhang, Q., Roy, K., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2013). Intrinsic dynamics of an extended hydrophobic core in the *S. cerevisiae* RNase III dsRBD contributes to recognition of specific RNA binding sites. *J. Mol. Biol.* 425, 546-562.
16. Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet.* 12, 225-232.
17. Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D* 66, 125-132.
18. Lamontagne, B., and Abou Elela, S. (2007). Short RNA guides cleavage by eukaryotic RNase III. *PLoS One* 2, e472.
19. Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2001). Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rnt1p nuclease. *Methods Enzymol.* 342, 159-167.
20. Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2004). Evaluation of the RNA determinants for bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J. Biol. Chem.* 279, 2231-2241.

- 1 21. Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Elela,
2 S. A. (2003). Sequence dependence of substrate recognition and cleavage by
3 yeast RNase III. *J. Mol. Biol.* 327, 985-1000.
- 4 22. Lamontagne, B., Hannoush, R. N., Damha, M. J., and Abou Elela, S. (2004).
5 Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic
6 RNase III: discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast
7 Rnt1p. *J. Mol. Biol.* 338, 401-418.
- 8 23. Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., and Elela, S. A. (2001). The RNase
9 III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA
10 metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 71-78.
- 11 24. Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. (2000). The N-terminal
12 domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a
13 dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol.*
14 *Cell. Biol.* 20, 1104-1115.
- 15 25. Lavoie, M., and Abou Elela, S. (2008). Yeast ribonuclease III uses a network
16 of multiple hydrogen bonds for RNA binding and cleavage. *Biochemistry* 47,
17 8514-8526.
- 18 26. Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D.
19 (2001). Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p
20 RNA processing. *EMBO J.* 20, 7250-7258.
- 21 27. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P.,
22 Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha
23 initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- 24 28. Li, W. M., Barnes, T., and Lee, C. H. (2010). Endoribonucleases - enzymes
25 gaining spotlight in mRNA metabolism. *FEBS J.* 277, 627-641.
- 26 29. Lykke-Andersen, J., and Garrett, R. A. (1997). RNA-protein interactions of an
27 archaeal homotetrameric splicing endoribonuclease with an exceptional
28 evolutionary history. *EMBO J.* 16, 6290-6300.

- 1 30. MacRae, I. J., and Doudna, J. A. (2007). Ribonuclease revisited: structural
2 insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 138-
3 145.
- 4 31. MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams,
5 P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA
6 processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- 7 32. Meaux, S., Lavoie, M., Gagnon, J., Abou Elela, S., and van Hoof, A. (2011).
8 Reporter mRNAs cleaved by Rnt1p are exported and degraded in the
9 cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* 39, 9357-9367.
- 10 33. Nagel, R., and Ares, M., Jr. (2000). Substrate recognition by a eukaryotic
11 RNase III: the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds
12 RNA containing a 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA* 6, 1142-1156.
- 13 34. Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial
14 ribonucleases. *FEMS microbiology reviews* 23, 371-390.
- 15 35. Nicholson, A. W. (2003). The ribonuclease superfamily: forms and functions in
16 RNA maturation, decay, and gene silencing, In *RNAi: A Guide to Gene*
17 *Silencing*, G. J. Hannon, ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring
18 Harbor Laboratory Press), pp. 149-174.
- 19 36. Nicholson, A. W. (2011). Ribonuclease III and the role of double-stranded RNA
20 processing in bacterial systems, In *Ribonucleases*, A. W. Nicholson, ed.
21 (Berline-Heidelberg: Springer), pp. 269-297.
- 22 37. Oppenheim, A. B., Kornitzer, D., Altuvia, S., and Court, D. L. (1993).
23 Posttranscriptional control of the lysogenic pathway in bacteriophage lambda.
24 *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 46, 37-49.
- 25 38. Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S.,
26 Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a
27 Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.* 19, 997-1009

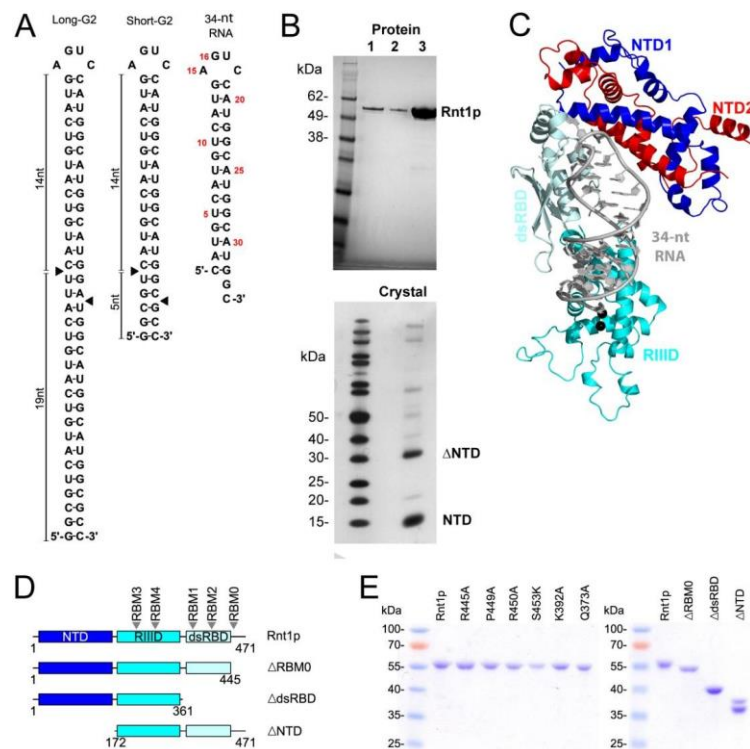
- 1 39.Redko, Y., Bechhofer, D. H., and Condon, C. (2008). Mini-III, an unusual
2 member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA
3 maturation in *B. subtilis*. *Mol. Microbiol.* 68, 1096-1106.
- 4 40.Robertson, H. D., Webster, R. E., and Zinder, N. D. (1968). Purification and
5 properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243, 82-91.
- 6 41.Sun, W., Jun, E., and Nicholson, A. W. (2001). Intrinsic double-stranded-RNA
7 processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III lacking the dsRNA-
8 binding domain. *Biochemistry* 40, 14976-14984.
- 9 42.Takeshita, D., Zenno, S., Lee, W. C., Nagata, K., Saigo, K., and Tanokura, M.
10 (2007). Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of
11 the C-terminal RNase III domain of human Dicer. *J. Mol. Biol.* 374, 106-120.
- 12 43.Wang, Z., Hartman, E., Roy, K., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2011). Structure
13 of a yeast RNase III dsRBD complex with a noncanonical RNA substrate
14 provides new insights into binding specificity of dsRBDs. *Structure* 19, 999-
15 1010.
- 16 44.Weinberg, D. E., Nakanishi, K., Patel, D. J., and Bartel, D. P. (2011). The
17 inside-out mechanism of Dicers from budding yeasts. *Cell* 146, 262-276.
- 18 45.Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2004). Structural basis for
19 recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-
20 binding domain of Rnt1p RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8307-8312.
- 21 46.Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human
22 Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for
23 ATP. *EMBO J.* 21, 5875-5885.
- 24 47.Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004).
25 Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*
26 118, 57-68.
- 27

1

Supplemental text and figures

2

1



2

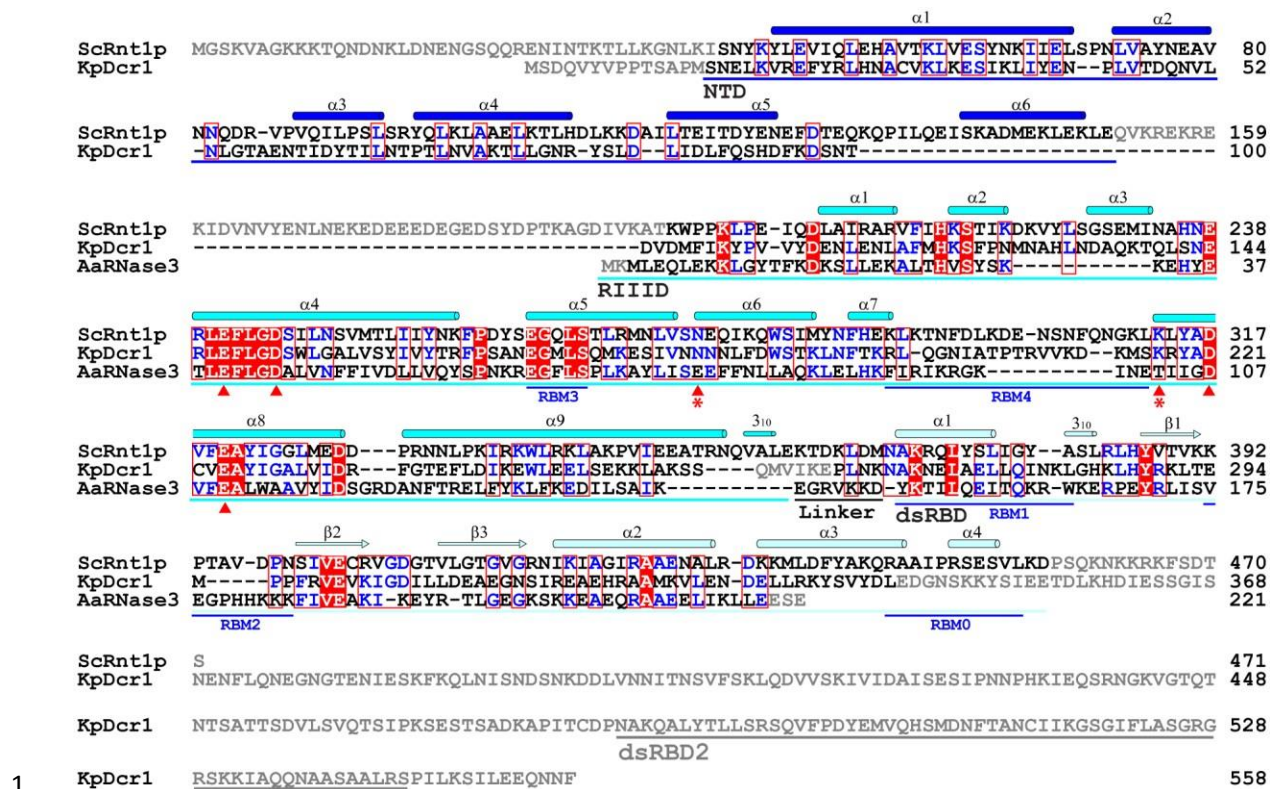
Figure S1. Composition and Quality of RNA and Protein Molecules Used in This Study, Related to Figure 1

(A) Sequence and secondary structure of the RNA oligos used in this study. The AGUC canonical substrates (G2) were designed to include the two canonical cleavage sites of Rnt1p. The 34-nt RNA was used for crystal structure determination, which represents the Rnt1p cleavage products. Arrowheads indicate Rnt1p cleavage sites. The Long- and Short-G2 indicate the sequence of Rnt1p substrates R31D and R31L (Lamontagne and Elela, 2004).

(B) Top: The Rnt1p protein used for crystallization was purified on 15S column and the resulting fragments separated on SDS-PAGE (Coomassie staining). The positions of Rnt1p and size markers are indicated on the sides. Lanes 1 and 2 were 1- μ l loads from two collection tubes and lane 3 was a 10- μ l load from one of the two tubes. Bottom: The Rnt1p protein degraded in the crystallization drops into the NTD and Δ NTD (RIID-dsRBD) fragments as revealed by the SDS-PAGE (Silver staining) of crystals. Additional bands revealed by silver staining on the gel of crystals (Bottom) may represent low levels of contaminations introduced during protein expression, purification, and/or crystallization that cannot be detected by less sensitive Coomassie staining.

(C) The content of the crystallographic asymmetric unit. (D) Schematic representation of different Rnt1p variants used in this study. The RBM positions are showed on top and the number of C-terminal residue for each Rnt1p variant is indicated. (E) The different Rnt1p mutants were purified using affinity chromatography and separated using SDS-PAGE. The size markers are indicated on the left of each gel image.

23



2 **Figure S2. Sequence and Structure of RNase III, Related to Figure 2**

3
4 Structural-based sequence alignment of ScRnt1p (this work), KpDcr1 (PDB entry 3RV0),
5 and AaRNase III (PDB entry 2EZ6). Structurally unobserved regions are indicated in grey.
6 Residues conserved in two and three sequences are indicated in blue and white,
7 respectively. The NTD, RIIID, and dsRBD of Rnt1p are underlined in blue, cyan, and pale
8 cyan, respectively. RBMs are underlined in blue. The four conserved residues in the
9 cleavage site of all RNase IIIs are marked with red triangles and those found only in
10 eukaryotic cleavage sites are indicated with stars. The secondary structure elements found
11 in the current Rnt1p:RNA structure are indicated on top.

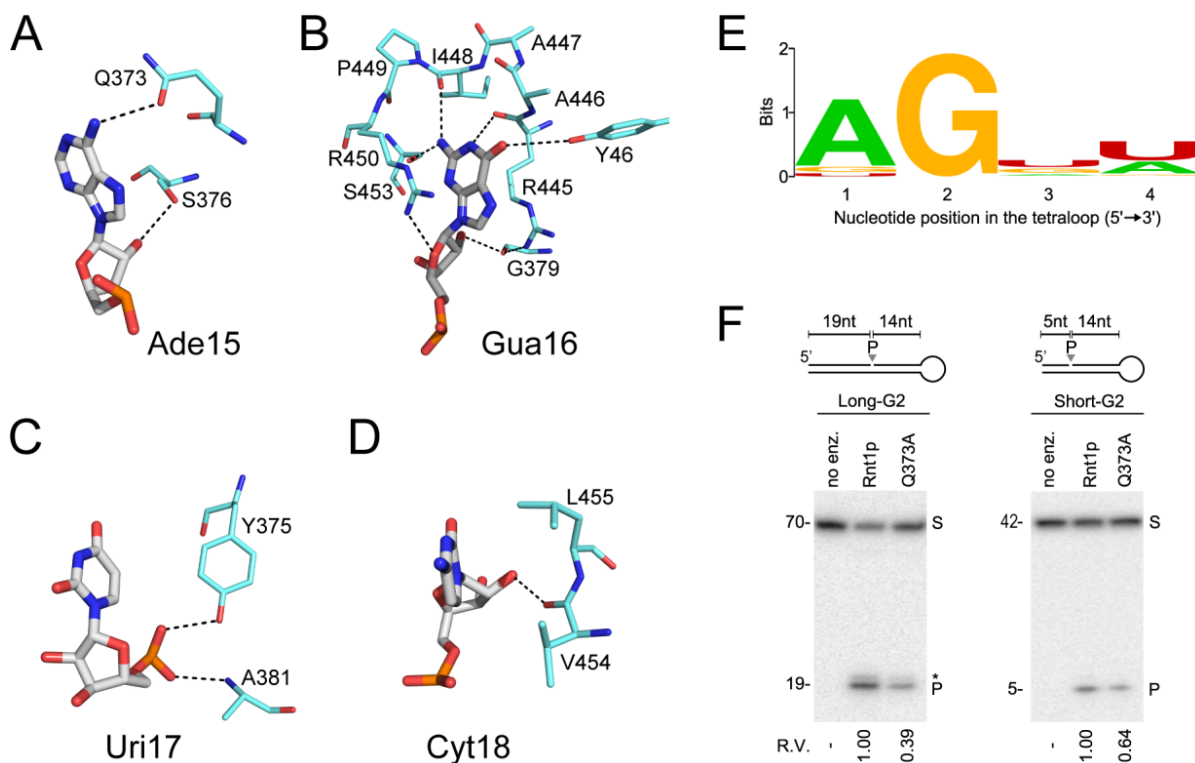


Figure S3. Structural Details of Rnt1p-Tetraloop Interactions and Impact of the Q373A Mutation on Substrate Cleavage, Related to Figure 3

(A-D) Interactions between Rnt1p and each of the four nucleotides in the AGUC tetraloop. Amino acids from RBMs 0 and 1 are shown as sticks in atomic color scheme (N in blue, O in red, and C in pale cyan). Nucleotides are shown as thicker sticks with carbon atoms in grey. Dashed lines indicate hydrogen bonds. (E) Tetraloop sequence distribution in 36 natural Rnt1p substrates (28 ncRNA, 2 introns, 5 mRNAs, and NPL3-GPI17 intergenic region). (F) The interaction between Q373 and the first nucleotide of the loop enhances cleavage by Rnt1p. Recombinant Rnt1p and the Q373A mutant were assayed for the cleavage of both Long- and Short-G2 substrates (S) under multiple turnover conditions (RNA excess) and physiological salt concentrations (150 mM KCl). The cleavage products (P) were separated on 20% denaturing acrylamide gel. Schemes representing the substrate properties are shown on top of gels and the fragment sizes shown on the left. The cleavage velocities relative to that of the unmodified enzyme (RV) are shown at bottom.

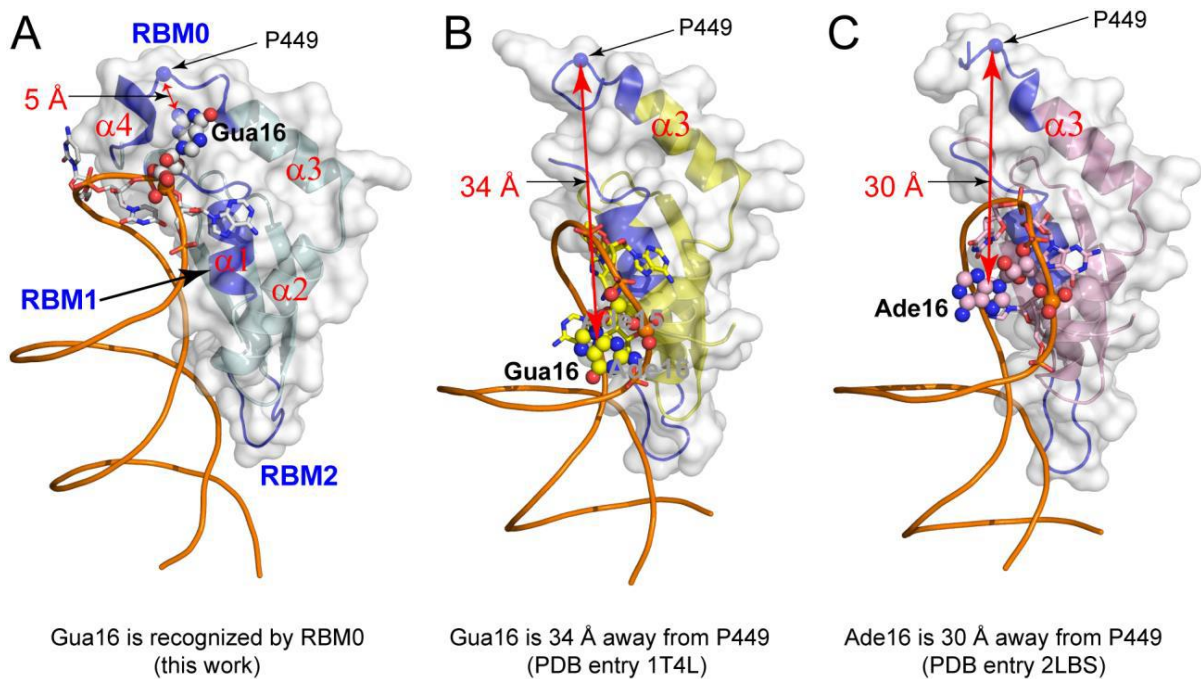


Figure S4. Recognition of the AGUC, AGAA, or AAGU Tetraloop by ScRnt1p, Related to Figure 4

(A-C) Side-by-side comparison of the dsRBD-tetraloop interactions determined in this study (Rnt1p:RNA^{AGUC}) with those previously obtained using truncated dsRBDs (dsRBD:RNA^{AGAA}, PDB entry 1T4L; dsRBD:RNA^{AAGU}, PDB entry 2LBS). The dsRBDs are shown as cartoons (helices as spirals, strands as arrows, and loops as tubes) in pale cyan for dsRBD:RNA^{AGUC} (A), yellow for dsRBD:RNA^{AGAA} (B), or pink for dsRBD:RNA^{AAGU} (C). RBMs are highlighted in blue and the dsRBDs outlined with transparent molecular surfaces in white. The C α position of P449 is indicated with a sphere as a reference point in the three structures for comparison. Tetraloops are shown as stick models colored by atom (N in blue, O in red, P in orange, and C in pale cyan for AGUC, yellow for AGAA, or pink for AAGU), overlapped with the stem-loop RNAs illustrated as tubes. The second nucleotide in the tetraloop (Gua16 or Ade16) is highlighted as spheres. The double-headed arrows indicate distances between the C α position of P449 and base of the second nucleotide in the tetraloop of stem-loop RNAs.

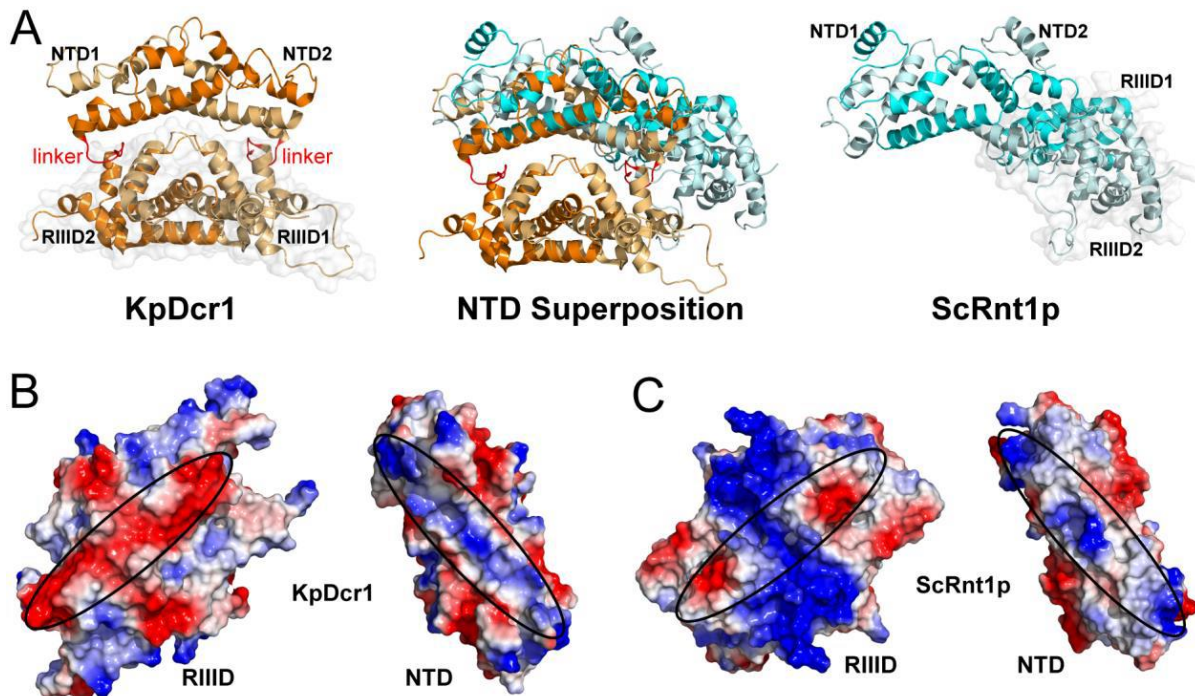


Figure S5. Distinct Positions of the NTD Dimer in Relation to the RIID Dimer in KpDcr1 and ScRnt1p, Related to Figure 6

(A) Dimeric structures of the NTD-RIID fragment of KpDcr1 (in orange and light orange, PDB entry 3RV1, on the left) and that of ScRnt1p (in cyan and pale cyan, this work, on the right) are superpositioned on the basis of C α positions in the NTD dimer (in the middle). The proteins are shown as cartoons (helices as spirals, strands as arrows, and loops as tubes) with the RIID dimers outlined with transparent molecular surfaces. (B) The complementary landscape and surface electrostatic potential (positive in blue, negative in red) between the RIID dimer and the NTD dimer of KpDcr1 (PDB entry 3RV1). (C) Neither the landscape nor the surface electrostatic potential for equivalent surfaces between the RIID dimer and the NTD dimer of ScRnt1p is compatible for KpDcr1-like back packing.

1 **Table S1. Kinetic and Binding Parameters of Rnt1p Proteins on the G2 Substrates, Related to**
2 **Figures 4, 5, and 6.**

Long-G2				
Protein	K_d (μM)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Rnt1p	1.47 ± 0.23	0.20 ± 0.08	4.48 ± 0.48	22.58 ± 9.26
S453K	9.06 ± 1.48	0.39 ± 0.18	0.69 ± 0.11	1.80 ± 0.88
R450A	11.39 ± 1.97	2.73 ± 2.05	1.25 ± 0.54	0.46 ± 0.40
P449A	5.77 ± 0.88	0.59 ± 0.20	3.27 ± 0.39	5.51 ± 1.96
R445A	> 20	ND	ND	ND
Q373A	2.09 ± 0.36	0.35 ± 0.13	0.95 ± 0.11	2.71 ± 1.06
K392A	1.88 ± 0.30	0.19 ± 0.04	2.96 ± 0.19	15.91 ± 3.95
ΔNTD	3.14 ± 0.53	ND	ND	ND
ΔdsRBD	> 20	ND	ND	ND
ΔRBM0	> 20	ND	ND	ND
Short-G2				
Protein	K_d (μM)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Rnt1p	3.24 ± 0.65	0.28 ± 0.08	3.42 ± 0.28	12.22 ± 3.62
S453K	> 20	ND	ND	ND
R450A	> 20	ND	ND	ND
P449A	> 20	ND	ND	ND
R445A	> 20	ND	ND	ND
Q373A	4.65 ± 0.93	0.84 ± 0.18	1.65 ± 0.17	1.97 ± 0.47
K392A	18.02 ± 4.22	ND	ND	ND
ΔNTD	5.61 ± 1.09	ND	ND	ND
ΔdsRBD	> 20	ND	ND	ND
ΔRBM0	> 20	ND	ND	ND

ND = Not determined.

Table S2. List of Oligonucleotides Used For PCR-directed Mutagenesis of Rnt1p, Related to Figures 3, 4, 5, and 6

RNT1-361REV-SalI	5'- CAT ATC AAG TTT GTC GAC TTA CTC CAA GGC AAC -3'
RNT1-445-REV-SAL-pQE31	5'- TTC ACT CCT AGG GTC GAC TTA TCT TTG TTT GGC -3'
RNT1-K392E-FOR	5'- AAA GAA CCC ACT GCA GTT GAT CCT AAT TCC ATA G -3'
RNT1-P449A-FOR	5'- CAA AGA GCT GCC ATT GCT AGG AGT GAA TCT GT -3'
RNT1-Q373A-FOR	5'- ATG AAT GCT AAA AGG GCG CTT TAC TCT TTG ATT -3'
RNT1-R445A-FOR	5'- TTT TAC GCC AAA CAA GCA GCT GCC ATT CCT AG -3'
RNT1-R450A-FOR	5'- AGA GCT GCC ATT CCT GCG AGT GAA TCT GTG TT -3'
RNT1-S453K-FOR	5'- ATT CCT AGG AGT GAA AAG GTG TTA AAA GAT CCC -3'
RNT1-FORBamHI-pQE31	5'- CTT TTC AAG GAT CCG GGC TCA AAA GTA GC -3'
RNT1-FULL-REV-SAL-pQE31	5'- TGG TTG TGT AAA GTC GAC TTA TCA GCT TGT ATC -3'

Supplemental Experimental Procedures

Sample Preparation for Crystallization

The full-length, wild-type Rnt1p (Figure S1B) was prepared as described (Lamontagne et al., 2001) with several modifications to the original protocol. Briefly, the *E. coli* strain M15 containing the expression vector pQE31-Rnt1p was incubated in a BioFlo 415 Fermentor (New Brunswick Scientific Co., Inc, NJ) to an OD600 value of 1.5 in super broth media containing 100 µg/ml ampicillin, and then induced with 1 mM isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside for additional 4 hr at 37°C. The cell lysis was performed using an APV-2000 homogenizer in buffer A [30 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, and 10% glycerol] containing 20 mM imidazole and protease inhibitor cocktails (Roche, CA). After centrifugation at 4°C and 15000 rpm for 30 min, the supernatant was loaded onto a nickel-chelating affinity column (HisPrep FF 16/10, GE Healthcare, CA) previously equilibrated with buffer A containing 20 mM imidazole. The impurities were washed out with buffer A containing 70 mM imidazole and the target protein was eluted with Buffer A containing 150 mM imidazole. Further purification of the dimeric form of Rnt1p was carried out by using a Superdex 200 column (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg, GE Healthcare, CA) with an elution buffer B [30 mM Tris HCl (pH 7.5) and 0.5 M

NaCl]. The final purification was performed with ion-exchange column (Source 15S, GE Healthcare, CA), and the Rnt1p was eluted with buffer C [50 mM phosphate buffer (pH 7.2), 300 mM NaCl]. The purified protein was dialyzed against buffer D [25 mM Tris HCl (pH 7.2), 200 mM NaCl] and concentrated to a concentration of 15 mg/ml.

The RNA oligo 5'-P-CAUGUCAUGUCAUGAGUCCAUGGCAUGGCAUGGC-3' (Figure S1A), which was based on the product of natural cleavage of the U5 snRNA 3' end, was purchased from Dharmacon, Inc, CO. The stock solution was prepared by dissolving the RNA powder in a buffer containing 25 mM Tris HCl (pH 7.2) and 100 mM NaCl to a concentration of 4 mM. Crystallization, Data Acquisition, and Crystal Structure Determination and Refinement The protein-RNA complex was made by incubation prior to crystallization. The mixed solution, containing 0.1 mM Rnt1p, 0.2 mM RNA, 150 mM KCl, and 25 mM MgCl₂ in 25 mM Tris HCl (pH 7.2), was incubated at 32°C for 30 min and then cooled on ice. Initial screening for crystallization conditions was carried out with a Hydra II Plus One robot system (Matrix Technologies Corporation). The hits of crystallization conditions obtained from the initial screenings were optimized and scaled up using the sitting-drop vapor diffusion method. Crystals suitable for X-ray diffraction were grown by mixing 3 µl protein-RNA solution and 1 µl reservoir solution [25% w/v PEG1000 in 0.1 M Tris HCl (pH 8.5)] and the 4-µl droplets were equilibrated against 300 µl reservoir solution. The plate-shaped crystals grew to the full size (~0.2 x 0.2 x 0.02 mm³) in two weeks. They were flash-cooled in liquid nitrogen after a short soak in the reservoir solution premixed with 35% (wt/vol) trehalose as a cryoprotectant. X-ray diffraction data were collected at beamline ID-22 of SER-CAT at the APS, Argonne National Laboratory. The structure was solved by molecular replacement (MR) using phenix.automr of the PHENIX program suite (Adams et al., 2010). The protein degradation made the MR search very difficult because it was hard to estimate the composition and solvent content of the crystal. The structure was finally determined by using an ensemble of monomeric RIIIDs from seven structures [KpDcr1 (PDB entries 3RV0 and 3RV1), AaRNase III (1YYW and

2NUG), *Thermotoga maritime* RNase III (1O0W), *Campylobacter jejuni* Rnc (3N3W and 3O2R), and mouse Dicer (3C4T)] and the Rnt1p dsRBD structure (1T4O) as the search models. The NTD dimer and RNA molecules were manually built into the difference density map. The structure was refined with phenix.refine of PHENIX (Adams et al., 2010) and model building and adjustment was carried out with COOT (Emsley and Cowtan, 2004). About 3% of the reflections were randomly selected for cross-validation. Magnesium ions and water molecules were included on the basis of difference electron density ($F_o - F_c$, above 3σ) and verified with omit maps. The refined structure was validated using the PROCHECK (Laskowski et al., 1993) and WHATIF (Hoof et al., 1996) programs as well as the validation server of PDB (<http://validate.rcsb.org/>). X-ray diffraction data and structure refinement statistics are listed in Table S1.

Preparation of Rnt1p Mutants for In Vitro Binding and Cleavage Assays

Point mutations in Rnt1p were generated using PCR-based targeted mutagenesis (Good and Nazar, 1992). Truncated versions of Rnt1p were created by single PCR amplification of the desired region within Rnt1p genomic locus. The Δ NTD mutant was previously described (Lamontagne et al., 2000). Purified PCR fragments were inserted between the BamH1/Sal1 sites of the pQE31 vector (Qiagen, Canada) and transformed into BL21 bacteria. Selected clones were sequenced to ensure that no mutations other than the desired ones were present. Proteins were expressed and purified as described (Lamontagne et al., 2001). Oligonucleotides used are listed in supplementary Table S3.

In vitro Cleavage Assays

Stem-loop RNA substrates derived from the U5 snRNA 3' end were produced with long (Long-G2) or short (Short-G2) stems, 5' -end-labeled with [γ - 32 P]ATP using T4

1 polynucleotide kinase (NEB, Canada), and purified by 20% PAGE. Cleavage
2 reactions were performed by incubating 30 nM Rnt1p with different substrates for 10
3 min at 30°C in the reaction buffer [30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM spermidine, 0.1
4 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 10 mM MgCl₂] supplemented with either 10 mM KCl
5 (low salt conditions) or 150 mM KCl (high salt conditions). For single turnover
6 reactions, trace amount of radiolabeled RNA (300 cpm/□l) was used. For multiple
7 turnover reactions, 3.2 μM unlabeled RNA was mixed with the trace amount of
8 radiolabeled RNA and added to the reaction. For determination of the Michaelis-
9 Menten constants, reactions were incubated for 1 min in the presence of 50 nM
10 enzyme with RNA concentration ranging between 0.05 and 3.2 μM. Cleavage
11 products were separated on 20% denaturing PAGE, visualized using a Storm 860
12 imager (Ge Healthcare, Canada), and quantified using QuantityOne software (Biorad).
13 Size markers were generated by alkaline hydrolysis of 5'-end-labeled RNA substrate.
14 KM and Vmax values were calculated using Michaelis-Menten non-linear regression
15 model. All experiments were repeated at least three times. Kinetic parameters are
16 summarized in Table S2. For ΔNTD, in vitro cleavage assay was also conducted with
17 the G2 substrates that were 3'-end- labeled with [γ-32P]pCp using T4 RNA ligase
18 (NEB, Canada), and purified by 20% PAGE.

20 **Supplemental Discussion**

22 **Hypothetical Model for Recognition of the AAGU Tetraloop by Rnt1p**

24 To date, a total of 43 stem-loop RNA substrates of yeast Rnt1p are known (Jules
25 Gagnon, Mathieu Lavoie, and Sherif Abou Elela, unpublished data). Among these 43
26 stem-loops, 42 are capped with an NGNN tetraloop (G2-loop), but snR48 exhibits an
27 AAGU tetraloop (A1-loop, Ghazal and Elela, 2006). The snR48 may represent a
28 second type of substrates, although another A1-loop has not been identified. The
29 requirement for the guanosine recognition by the G-clamp raises the question of how

1 Rnt1p binds and cleaves an A1-loop. Previous studies have shown that the AAGU
2 tetraloop (Figure S4C) adopt a backbone conformation that is similar to that of a G2-
3 loop (Figure S4B) upon binding to the dsRBD of Rnt1p (Wang et al., 2011).
4 Accordingly, comparison of our structure (Figure S4A) with the two previously
5 obtained (Figures S4B, S4C) suggests that the presence of the G-clamp may induce
6 a considerable conformational change in the backbone of the RNA. Moreover, the
7 point mutations in the G-clamp has comparable effects in the A1 (Long- and Short-
8 A1, resulted from substitution of the AGUC tetraloop in the G2 substrates with the
9 AAGU tetraloop, Figure S1A) and G2 substrates (data for the two A1 substrates are
10 not shown), suggesting that the G-clamp may be required for the recognition of both
11 substrate types. Thus, we hypothesize that upon binding of the enzyme to the AAGU
12 tetraloop, the RNA may adopt a conformation that allows the guanosine in the third
13 position of the tetraloop to be recognized by the G-clamp. Recognition of the third
14 nucleotide of the tetraloop rather than the second suggests that the resulting structure
15 of the complex has to be somewhat different between G2 and A1 substrates. This
16 model is in agreement with previous biochemical data that suggest that the binding
17 mode of Rnt1p on the RNA and the hydrogen bond interactions are slightly different
18 between A1 and G2 substrates (Ghazal and Elela, 2006). Additional structural
19 information is essential for the characterization of A1-binding mode by Rnt1p.

20

Supplemental References

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* 66, 213-221.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* 60, 2126-2132.
- Ghazal, G., and Elela, S. A. (2006). Characterization of the reactivity determinants of a novel hairpin substrate of yeast RNase III. *J. Mol. Biol.* 363, 332-344.
- Good, L., and Nazar, R. N. (1992). An improved thermal cycle for two-step PCR-based targeted mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 20, 4934.
- Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272.
- Lamontagne, B., and Elela, S. A. (2004). Evaluation of the RNA determinants for bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J. Biol. Chem.* 279, 2231-2241.
- Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., and Elela, S. A. (2001). The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 71-78.
- Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. (2000). The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1104-1115.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* 26, 283-291.
- Wang, Z., Hartman, E., Roy, K., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2011). Structure of a yeast RNase III dsRBD complex with a noncanonical RNA substrate provides new insights into binding specificity of dsRBDs. *Structure* 19, 999-1010.

CHAPITRE 3

La réactivité des substrats de Rnt1p est encodée dans la structure du produit de réaction.

Les études précédentes de notre laboratoire ont permis d'établir qu'en plus de la sélectivité de Rnt1p envers les tétraboucles NGNN la composition de séquence près du site de coupure influence l'efficacité du clivage par Rnt1p. Cependant, aucun mécanisme n'a été caractérisé pour expliquer ce phénomène. Dans cet article, j'ai mis au point deux nouvelles méthodes, qui permettent de suivre en temps réel la réaction catalysée par Rnt1p ainsi que l'interaction avec les substrats et les produits de réaction. Ces analyses ont déterminé que l'activité enzymatique de Rnt1p est inhibée par le produit de réaction. Plus spécifiquement, l'activité est déterminée par la vitesse de relâchement du produit de réaction du complexe enzymatique. De manière étonnante, cette inhibition par le produit dépend de la nature de la boucle. Ainsi un produit de réaction émanant d'un site de maturation d'ARNnc est beaucoup moins inhibiteur qu'un produit de réaction provenant d'un site de dégradation d'ARNm. Cette inhibition est modulée par la présence d'au moins deux paires de bases directement au-dessus du site de clivage et nous indique que l'efficacité à laquelle Rnt1p clive ses substrats serait encodée dans la structure du produit de réaction.

1 Les résultats de cet article sont importants sur plusieurs points :

2

- 3 - Ils permettent de déterminer l'activité catalytique de Rnt1p en état d'équilibre et de
4 pré-équilibre.
- 5 - Ils permettent de démontrer que le taux de roulement de l'enzyme est dépendant
6 de l'inhibition par le produit de réaction.
- 7 - Ils démontrent que cette inhibition par le produit est encodée dans la structure
8 même du substrat de départ permettant de cliver une variété de substrats à
9 différents niveaux d'efficacité.

10

11 Pour cette étude j'ai mis au point et effectué l'ensemble des expériences et des
12 figures de l'article à l'exception de la figure 7C effectuée par Sherif Abou Elela. J'ai
13 aussi écrit le manuscrit, conjointement avec Sherif Abou Elela et Daniel Lafontaine.

14

15 Référence complète : Comeau, M.A., Lafontaine, D.A., and Abou Elela, S. (2016).
16 The catalytic efficiency of yeast ribonuclease III depends on substrate specific
17 product release rate. *Nucleic Acids Res.* 44, 7911–7921.

18

19

The catalytic efficiency of yeast ribonuclease III depends on substrate specific product release rate

Marc-Andre Comeau¹, Daniel A. Lafontaine^{1*} and Sherif Abou Elela^{2*}

Université de Sherbrooke Centre of Excellence in RNA Biology

¹ Département de biologie, Faculté de science, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1E 2R1, Canada.

² Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Pavillon de recherche appliquée sur le cancer, Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada.

* To whom correspondence should be addressed.

Email: Sherif.Abou.Elela@USherbrooke.ca

Tel: 819-821-8000 x75275; Fax: 819-820-6831

Email: Daniel.Lafontaine@USherbrooke.ca

Tel: 819-821-8000 x65011

Short title: **Substrate-Dependent Modulation of RNase III Turnover**

Key words: RNase III, RNA degradation, dsRNA binding proteins, enzymatic turnover, product inhibition, Rnt1p, Ribonuclease reactivity

1 **ABSTRACT**

2

3 Members of the Ribonuclease III (RNase III) family regulate gene expression by
4 triggering the degradation of double stranded RNA (dsRNA). Hundreds of RNase III
5 cleavage targets have been identified and their impact on RNA maturation and stability
6 is now established. However, the mechanism defining substrates reactivity remains
7 unclear. In this study, we developed a real-time FRET assay for the detection of
8 dsRNA degradation by yeast RNase III (Rnt1p) and characterized the kinetic
9 bottlenecks controlling the reactivity of different substrates. Surprisingly, the results
10 indicate that Rnt1p cleavage reaction is not only limited by the rate of catalysis but
11 can also be modulated by the base-pairing of product termini. Cleavage products
12 terminating with paired nucleotides, like the degradation signals found in coding
13 mRNA sequence, were less reactive and more prone to inhibition than products
14 having unpaired nucleotides found in non-coding RNA substrates. Mutational analysis
15 of U5 snRNA and Mig2 mRNA confirms the pairing of the cleavage site as a major
16 determinant for the difference between cleavage rates of coding and non-coding RNA.
17 Together the data indicate that the base-pairing of Rnt1p substrates encodes reactivity
18 determinants that permit both constitutive processing of non-coding RNA while limiting
19 the rate of mRNA degradation.

20

21

1 INTRODUCTION

2
3 RNase III is a ubiquitous dsRNA processing enzyme found in all kingdoms of life
4 except archaeobacteria (1,2). Members of the RNase III family are defined by the
5 presence of the catalytic (RIIID) (3) (4) and the dsRNA-binding (dsRBD) (5) domains,
6 which were first identified in bacteria (6). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,
7 Rnt1p is an RNase III ortholog involved in the degradation of unspliced mRNA (7,8),
8 conditional mRNA decay (9-11) and the processing of many non-coding RNAs such
9 as small nuclear RNAs (snRNAs) (12-16), pre-rRNAs (17) and small nucleolar RNAs
10 (snoRNAs) (8). In the case of non-coding RNA like the U5 snRNA a robust and
11 constitutive reactivity is required to ensure the maturation of the hundreds of RNA
12 molecules required for the spliceosome (13). In contrast, the degradation of mRNA
13 produced by scarcely expressed genes like the glucose dependent gene *MIG2* or the
14 telomerase subunit gene *EST1* requires moderate substrate reactivity that permits
15 controlled and often conditional RNA cleavage (9,18). Indeed, insertion of different
16 Rnt1p cleavage signals in a heterologous reporter indicated that substrates originating
17 from non-coding RNA are much more reactive than those originating from mRNA (19).
18 However, the mechanism generating this differential substrate reactivity remains
19 unclear.

20
21 Rnt1p recognizes RNA substrates with stem-loop structures containing NGNN
22 tetraloops (G2-tetraloop) (20). The enzyme identifies its substrate by interacting with
23 multiple nucleotides within the loop and its neighbouring stem structure (21). In
24 general, a G2-tetraloop with a minimum of three base pairs (22) is required for two
25 specific cleavages to occur at 14 and 16 nucleotides from the terminal loop (Figure
26 1A). The typical cleavage reaction produces a 34-nucleotide stem-loop structure
27 terminating with a 3' overhang and two RNA fragments corresponding to the
28 sequences upstream and downstream of the cleavage site (Figure 1A) (23,24). The

1 tetraloop structure is essential for the recognition and cleavage of the G2 substrates,
2 while the sequence of the stem modulates the substrate turnover rate (22,24) by an
3 as yet unidentified mechanism.

4
5 Recent work has indicated that the enzyme uses a special clamp-like structure at the
6 end of the dsRBD domain to specifically recognize the conserved guanine in the
7 second position of the loop (22). The structure of the catalytic complex is assembled
8 through interaction with the substrate via five RNA binding motifs (RBMs). As indicated
9 in Figure 1A, RBM0, which contains the clamp structure, interacts with the G2-loop
10 during the initial steps of the complex formation. In addition, Rnt1p employs RBM1 to
11 interact with the nucleotides adjacent to the tetraloop, RBM2 and RBM4 interact with
12 the RNA of the stem and RBM3 contacts the nucleotides surrounding the cleavage
13 site (22). Most binding sites are maintained with the cleavage product except RBM3,
14 which binds less stably after catalysis (Figure 1A).

15
16 RNase III binds its substrates in the absence of divalent metal ions (25) but requires
17 Mg^{2+} for cleavage. The divalent metal ions position and activate water molecules,
18 located near the cleavage site, to induce catalysis (2). The rate of the hydrolytic step
19 is dependent on the metal ion's pK_a (30). Hydrolysis leads to the generation of
20 products terminating with 3'-hydroxyl and 5'-phosphomonoester groups (22,26-28).
21 Chemical substitution near Rnt1p substrate's scissile bonds indicated that it is the
22 position of the phosphodiester backbone relative to the enzyme rather than the 2'-OH
23 groups that is critical for cleavage by Rnt1p (28).

24
25 Biochemical and structural analysis of Rnt1p suggest that RNA recognition is initiated
26 by a base-specific interaction between the G-clamp (RBM0) and the second
27 nucleotide of the loop (22). This interaction is formed to strengthen the complex and

1 to prevent catalytic domain slippage along the RNA helix (22). If this initial recognition
2 is successful, the substrate is loaded into the nuclease domain through direct
3 interactions with the Rnt1p RBM1-4 and then cleaved at a fixed distance from the loop
4 (22). The process leading to product release and its impact on the turnover rate of
5 Rnt1p, and of RNase III enzymes in general, is not fully understood. Comparison
6 among different Rnt1p cleavage signals indicates wide variation in substrate turnover
7 rate. In general, it was shown that rRNA and snoRNA substrates are much more
8 efficiently cleaved, *in vivo* and *in vitro*, by Rnt1p than mRNA substrates (e.g. Mig2 and
9 Fit2). However, the molecular mechanisms controlling the reactivity of different Rnt1p
10 substrates remain unclear. Despite decades of biochemical and genetic analyses of
11 RNase III orthologs, we still do not know how different substrates modulate the
12 enzyme's turnover to meet the requirement of transcript with diverse cellular
13 requirement.

14
15 To understand the mechanisms controlling the reactivity of Rnt1p substrates, we
16 developed a fluorescence assay to monitor the real time kinetics of Rnt1p cleavage
17 activity and to identify the critical steps in the enzymatic reaction. Our results indicate
18 that the substrate reactivity is defined by the rate of product release and suggest that
19 the base-pairing surrounding the cleavage site determines the substrate turnover rate.
20 Products generated from the cleavage of efficiently processed substrates, like U5
21 snRNA, have low affinity for the enzyme and thus have high dissociation rates. In
22 contrast, products generated from inefficiently cleaved substrates, like Mig2 mRNA,
23 have high affinity and slow dissociation rates. Comparison of the products generated
24 by substrates with different cleavage rates indicates that base pairing upstream of the
25 cleavage site reduces the rate of product release and decreases turnover.
26 Consistently, disruption of base pairing near the cleavage site increased the turnover
27 rate by promoting product dissociation. Together, our data reveal a mechanism
28 whereby the reactivity of yeast RNase III substrates might be modulated based on the

base-pairing surrounding the cleavage site to meet the demand of genes with different functions and expression levels.

MATERIAL & METHODS

Real-time analysis of Rnt1p cleavage kinetics

Recombinant enzyme was expressed and purified as previously described (29). Synthetic RNA with 6-FAM at the 5' end and an amino linker at the 3' end was obtained from Integrated DNA Technologies (IDT - Coralville, Iowa). Labeling of the RNA target portion (Figure 1B) was completed by incubating 150 µg of RNA with 25 µg of Cy3 dye overnight in 0.1 M sodium tetraborate at pH 8.5. The labeled RNA was purified using 20% PAGE and extracted via electro-elution (29). The bipartite RNA substrate was reconstituted by annealing 50 to 1600 nM of a 1:8 mix of labeled to unlabeled target strands to an equal amount of guide RNA as previously described (21). Cleavage reactions were performed at 30 °C using 7.5 nM of purified Rnt1p in a reaction buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM spermidine, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 10 mM MgCl₂. The monovalent salt concentration was 150 mM KCl unless noted otherwise. RNA cleavage was monitored in real-time using a Quanta Master system (PTI, London, Ontario) or Flex Station (Molecular Device, Sunnyvale, CA) by exciting the fluorophores at 490 nm and monitoring the fluorescence emission at 520 nm. The cleavage reaction was stopped by adding a solution containing 75 mM EDTA and 85% formamide, and the cleavage products were separated using 20% PAGE. The fluorescent cleavage products were visualized on Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences, Burnaby, BC) with the fluorescein channel. The cleavage rates of cleavage reactions were either determined by linear regression or, in case of

1 biphasic reaction, with non-linear fitting of an exponential burst phase followed by a
2 linear steady-state phase over the first minute of reaction (30) according to the
3 following model: $Y = Y_{fast}(1 - e^{-k_{fast} * t}) + k_{slow} * t$. The kinetic parameters were
4 calculated using a standard Michaelis-Menten model. The product inhibition assays
5 were conducted using 800 nM of synthetic RNA products added to the reaction.

7 **In vitro cleavage assay**

8 Xrn1p protein was purified as previously reported (31). Standard gel-based Rnt1p
9 cleavage assays were performed using 30 nM Rnt1p and trace amounts of internally
10 radiolabeled RNA already mixed with 1600 nM unlabeled RNA in a standard reaction
11 buffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM spermidine, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10
12 mM MgCl₂ and 150 mM KCl). The effect of product inhibition on Rnt1p cleavage was
13 tested by including 74 nM of purified Xrn1p to the standard Rnt1p cleavage assay.
14 The specificity of the Xrn1p effects was tested by incubating Xrn1p with the RNA in
15 the absence of Rnt1p. An equal amount of inactive (boiled) Xrn1p was added in Rnt1p
16 cleavage assays. Product titration reactions were performed using trace amounts of
17 5' radiolabeled RNA, already mixed with 1600 nM of unlabeled RNA, in the presence
18 of 0 to 3.200 µM synthetic Rnt1p products. All in vitro assays were carried out for 10
19 minutes, stopped by the addition of 85% formamide (Bioshop Canada, Burlington,
20 Ontario) containing 75 mM EDTA, pH 8.0, and resolved on a 20 % PAGE. The
21 cleavage products were visualized using autoradiography as previously described
22 (29)

24 **Surface plasmon resonance binding assay**

25 RNA binding to purified Rnt1p was monitored using a Biacore T200 system (GE
26 Healthcare Life Sciences, Burnaby, BC). The assays were carried out in binding buffer
27 containing 30 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl and 10 nM EDTA. The effect of

magnesium ions was tested by adding 10 mM MgCl₂ to the reaction. His-tagged Rnt1p was immobilized on Ni-NTA chip via the His-tag prior to RNA injection. The surface was washed with 350 mM EDTA and 0.1% SDS between each sample injection. Binding was calculated relative to the amount of proteins bound to the chip for each RNA concentration to generate resonance unit change (RU) over the theoretical maximal RU (R_{max}) values. RNA concentrations ranging from 50 nM to 1600 nM were used for each binding assay. On (association) and off (dissociation) rates were calculated with Biacore T200 software using a single binding site model on all curves.

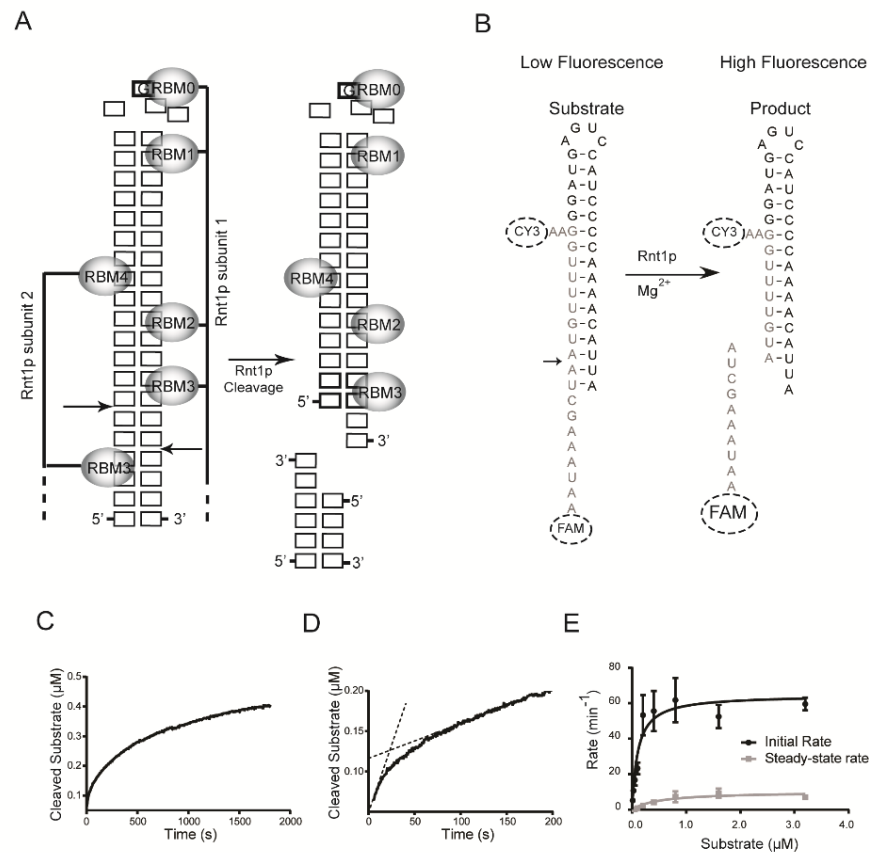
RESULTS

Design of a fluorescent reporter of Rnt1p cleavage activity

We have previously shown that Rnt1p can use short RNA transcripts as guides for the cleavage of RNA targets *in trans* (21,32). In this assay we annealed guide and target RNAs to generate highly reactive bipartite substrates that undergo RNA processing *in vivo* (32) and mimic the cleavage kinetics of natural substrates *in vitro* (21). In this study, we further developed this bipartite system by generating a fluorescent reporter for real time observation of Rnt1p cleavage kinetics. The reporter was generated by annealing an unlabeled guide RNA to a target strand labeled with both fluorescent donor (6-FAM) and acceptor (Cy3) dyes (Figure 1B). Cleavage of the reporter generates 3 RNA fragments (Figure 1B), a short single stranded 5' fragment (PI), an intermediate single stranded fragment (P2) and a 3' end stem loop structure (PIII). PI and PIII retain significant sequence complementarity and are expected to remain in complex after cleavage generating only one product capable of binding to Rnt1p (32). Indeed, the PI/PIII mixture and its associated bipartite substrate generate similar

1 circular dichroism spectrums under cleavage conditions confirming similar overall
2 helicity of these two structures (Supplementary Figure 1F). The intact RNA target is
3 expected to generate low signal due to the fluorescence resonance energy transfer
4 (FRET) occurring between the fluorophores (33). However, once the RNA substrate
5 is cleaved, the fluorescence signal is expected to increase as no more FRET occurs
6 between 6-FAM and the Cy3 quencher. To test this reporter, we first monitored Rnt1p
7 cleavage under multiple turnover conditions with an excess of substrate.

8



9

10 **Figure 1: Continuous fluorescence assay of Rnt1p cleavage reveals rapid pre-steady**
11 **state kinetics.**

12 A) Mechanism of Rnt1p binding and cleavage. Rnt1p G2-substrate is shown in the form of a
13 stem sloop structure. The nucleotides are shown as boxes and the position of the conserved
14 guanine is indicated by G. The canonical structure of Rnt1p substrates is outlined and its RNA

1 binding motifs (RBM) are indicated as gray circles. In this model, cleavage eliminates the
2 interaction between Rnt1p and the RNA sequence downstream of the cleavage site, which
3 permits the enzyme to discriminate between the substrates and its products. B) Strategy for
4 detecting Rnt1p-mediated cleavage in real-time. Schematic representation of the bipartite
5 substrates used for the fluorescence cleavage assay. The substrate is created by annealing
6 an RNA strand (shown in grey) labeled with fluorescent dyes (6-FAM and CY3) to the G2-
7 stem loop (shown in black). Rnt1p cleavage releases the 6-FAM dye from the CY3 quencher,
8 which permits the detection of the enzyme catalytic activity in real-time. C) Fluorescence
9 profile of Rnt1p cleavage. The substrate shown in B (0.8 μ M) was incubated with the enzyme
10 under physiological salt conditions (150 mM) and the change in fluorescence was
11 continuously monitored for 30 minutes. D) Analysis of Rnt1p early cleavage kinetic reveals
12 two distinct catalytic rates. The profile of the first 200 seconds of the cleavage reaction shown
13 in C was expanded to reveal the biphasic nature of Rnt1p cleavage kinetics. The dashed line
14 indicates the predicted trajectory of catalysis in each phase. E) Comparison between the
15 kinetic profiles of initial and steady-state rates of catalysis. The Michaelis-Menten graph was
16 generated based on the initial and steady-state rates for concentrations of substrate from 50
17 nM to 1600 nM. The data shown are the average of at least three independent assays and
18 the standard deviations are shown in the form of error bars.

21 The cleavage reaction was performed at physiological monovalent salt concentration
22 (i.e. 150 mM KCl), which provides optimal specificity and turnover rate (29). The
23 cleavage reaction was initiated by adding 10 mM MgCl_2 to a reaction buffer containing
24 Rnt1p and the fluorescent substrate (see Material and Methods). As indicated in
25 Supplementary Figure 1A, a strong increase in fluorescence was detected after
26 initiating the reaction and the signal level was directly related to the proportion of
27 cleaved substrates (Supplementary Figure 1B). Incubating the reporter substrate with
28 increasing amounts of Rnt1p in the absence of MgCl_2 , which permits binding but not
29 cleavage of the RNA (25), did not affect the fluorescence signal (Supplementary
30 Figure 1C). This indicates that cleavage is required for the generation of the
31 fluorescence signal. Comparison between the fluorescence and conventional gel-
32 based cleavage assay indicated that both methods generate similar cleavage kinetics,
33 both as a function of time (Supplementary Figure 1D) and of optimum substrate
34 concentrations (Supplementary Figure 1E). Together these experiments demonstrate
35 the utility and precision of our bipartite fluorescent substrate as a reporter of Rnt1p
36 catalytic activity.

1

2 **Monitoring Rnt1p cleavage kinetics in real time**

3

4 To determine the real time kinetics of Rnt1p-mediated cleavage, we plotted product
5 accumulation over time (Figure 1C). Measuring the cleavage rate over a range of
6 substrate concentrations yielded a catalytic rate constant (k_{cat}) of $64.7 \pm 5.8 \text{ min}^{-1}$ for
7 the burst phase and $10.1 \pm 1.2 \text{ min}^{-1}$ for the steady-state phase (Figure 1E). We also
8 observed that the K_m is increased from $0.11 \pm 0.04 \text{ }\mu\text{M}$ for the burst phase to $0.51 \pm$
9 $0.17 \text{ }\mu\text{M}$ in the steady-state phase (Supplementary Figure 2B and Supplementary
10 Table 1). To evaluate the contribution of binding affinity to the decreased rate of the
11 steady-state phase, we monitored the cleavage kinetics at increasing concentrations
12 of monovalent salts, which weakens the interaction of Rnt1p with its substrates (25).
13 As predicted, increasing the salt concentration to 500 mM disrupted the biphasic
14 progression of the cleavage reaction (Supplementary Figure 1E). This suggests that
15 the slower rate of the steady-state is not due to a decrease in the complex stability but
16 instead points at steps after the initial recognition and binding of the substrates.

17

18 **The cleavage products determine the turnover rate of Rnt1p**

19

20 To examine the contribution of cleavage-product dissociation to Rnt1p kinetics, we
21 synthesized RNA molecules that mimic the stem-loop structure produced by Rnt1p
22 cleavage (Figure 2A), and monitored their impact on turnover. As shown in Figure 2B,
23 the addition of products to the cleavage reaction reduced the initial rate of catalysis
24 and eliminated the burst phase (Figure 2B). When analyzing the product inhibitory
25 effect at various substrate concentrations, we found that the presence of $0.8 \text{ }\mu\text{M}$
26 products reduced the value of the initial phase k_{cat} by 5 fold ($12 \pm 5 \text{ min}^{-1}$) (Figure 2C
27 and Supplementary Table 1). The reduction of Rnt1p activity by the product is

1 impaired when the reaction is carried out with a buffer containing 500 mM KCl, which
2 reduces the stability of Rnt1p / RNA complex (Supplementary Figure 2C and D). This
3 indicates that the capacity of the product to inhibit the cleavage reaction depends on
4 its capacity to form a stable complex with the enzyme and suggest that the substrate
5 binding to the enzyme is more stable than its product.

6
7 Given that Rnt1p catalytic activity appears to be inhibited by the accumulation of
8 cleavage products, we reasoned that the elimination of these products should
9 increase the cleavage rate. To test this hypothesis we monitored the cleavage reaction
10 after the addition of a recombinant version of the 5'-3' exoribonuclease Xrn1p (34),
11 which was previously shown to degrade the 3' product of Rnt1p *in vivo* and *in vitro*
12 without affecting the substrates (10,19). In the case of the fluorescent reporter, Xrn1p
13 will degrade the intermediate cleavage product of Rnt1p (PII, Figure 1A), which
14 possess 5' monophosphate, and leaves behind a short stem-loop structure and single
15 stranded fragments. Degradation of the intermediate products (PII) eliminate all base
16 pairing near the cleavage site and increases the difference between the structure of
17 the substrate and its product. As predicted, the addition of Xrn1p to the cleavage
18 reaction significantly increased the steady state catalytic rate of Rnt1p without
19 affecting the initial burst phase (Figure 2D). These data confirm the inhibitory effects
20 of the cleavage products and underline their role in defining the steady state cleavage
21 rate.

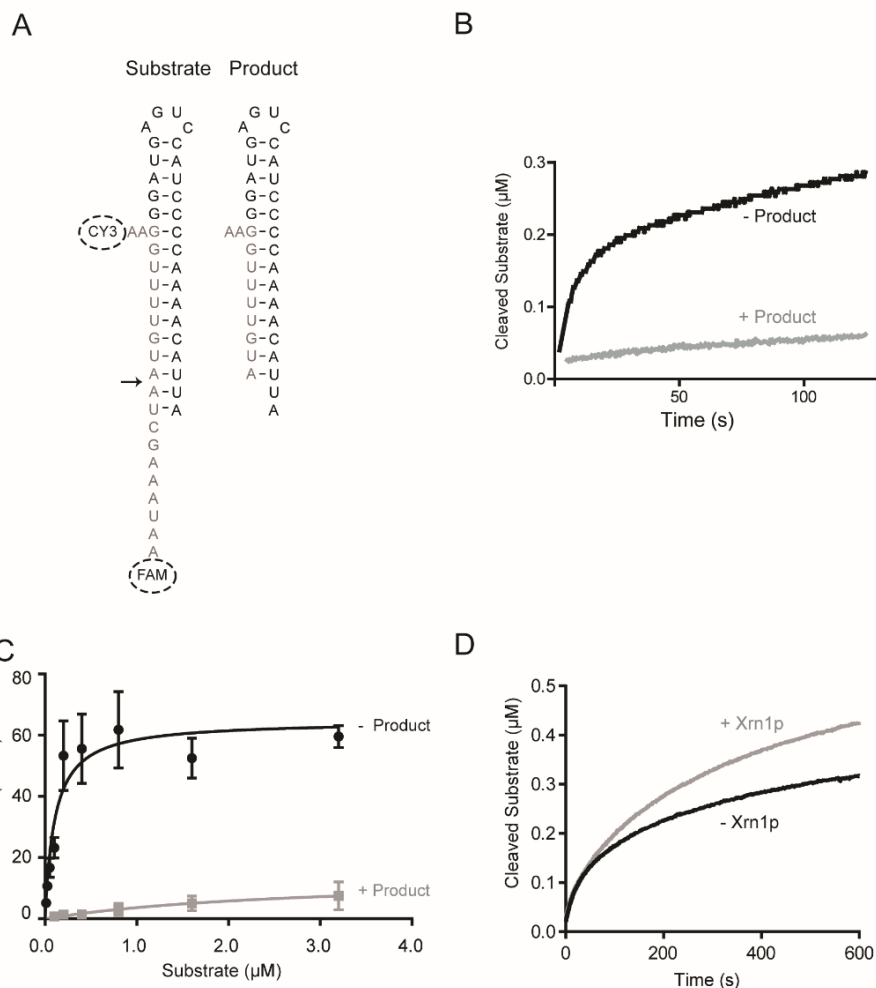


Figure 2: The steady state kinetics of Rnt1p is defined by sustained product inhibition.

A) Comparison between the substrate and product. The predicted structure of Rnt1p substrate (TL) and its derived product (TL-PR) are shown in the form of a stem loop. The arrow indicates the position of the cleavage site. The cleaved strand is shown in grey. B) Rnt1p products reduce enzymatic reactivity. The fluorescence profile of Rnt1p cleavage over time was determined as described in Figure 1C without product (- Product) or with the addition of equimolar amounts (0.8 μM) of Rnt1p product (+ Product). C) Rnt1p products reduce the rate of catalysis. The Michaelis-Menten kinetics of the initial rate of the reaction was determined in the absence (- Product) or the presence of 0.8 μM of the cleavage product (+ Product). The data shown are the average of at least three independent experiments and the standard deviations are shown in the form of error bars. D) Product removal enhances Rnt1p reactivity. The fluorescence profile of Rnt1p cleavage over time was determined as described in Figure 1C in the presence (+ Xrn1p) or the absence (-Xrn1p) of the 5'-3' exoribonuclease Xrn1p.

Rnt1p reactivity is modulated by substrate-specific cleavage product inhibition

Rnt1p RNA substrates are expressed at different levels and their turnover requirement varies based on the function of the mature RNA (8) (18) (11). For example, while efficient production of mature rRNA and snoRNAs may require rapid and constitutive cleavage by Rnt1p (8), selective degradation of mRNAs need well controlled and in many cases conditional reactivity (9). To determine the impact of the substrate's natural structures on Rnt1p reactivity, we compared the reactivity of substrates with different levels of expression. The stem-loop structures found within the coding sequence of the glucose induced transcription repressor Mig2 (9) and the putative ATPase Yta6 (10,35) were chosen as model mRNA substrates, while the U5 snRNA (13) and U2 snRNA (12) processing signals were selected as representative non-coding RNA (Figure 3A). The different substrates were transcribed in vitro using T7 RNA polymerase and incubated with Rnt1p in the presence or the absence of the exoribonuclease Xrn1p to monitor the impact of product cleavage on the steady state reaction kinetics. Interestingly, the addition of Xrn1p did not alter the processing of the non-coding RNA U2 and U5, but it significantly enhanced the cleavage of the model mRNA substrates Mig2 and Yta6 (Figure 3B). To directly evaluate the effect of the cleavage products on Rnt1p reactivity, we monitored the impact of adding synthetic RNAs mimicking the products generated by the cleavage of the U5 snRNA (U5-PR) or the Mig2 mRNA (Mig2-PR) on the cleavage of U5 and Mig2. As indicated in Figures 3C and 3D, the processed Mig2 inhibited the cleavage of both Mig2 and U5, while U5 cleavage product did not. Accordingly, the addition of Mig2 products (but not U5) decreased the k_{cat} of the heterologous substrate TL (Figure 3E).

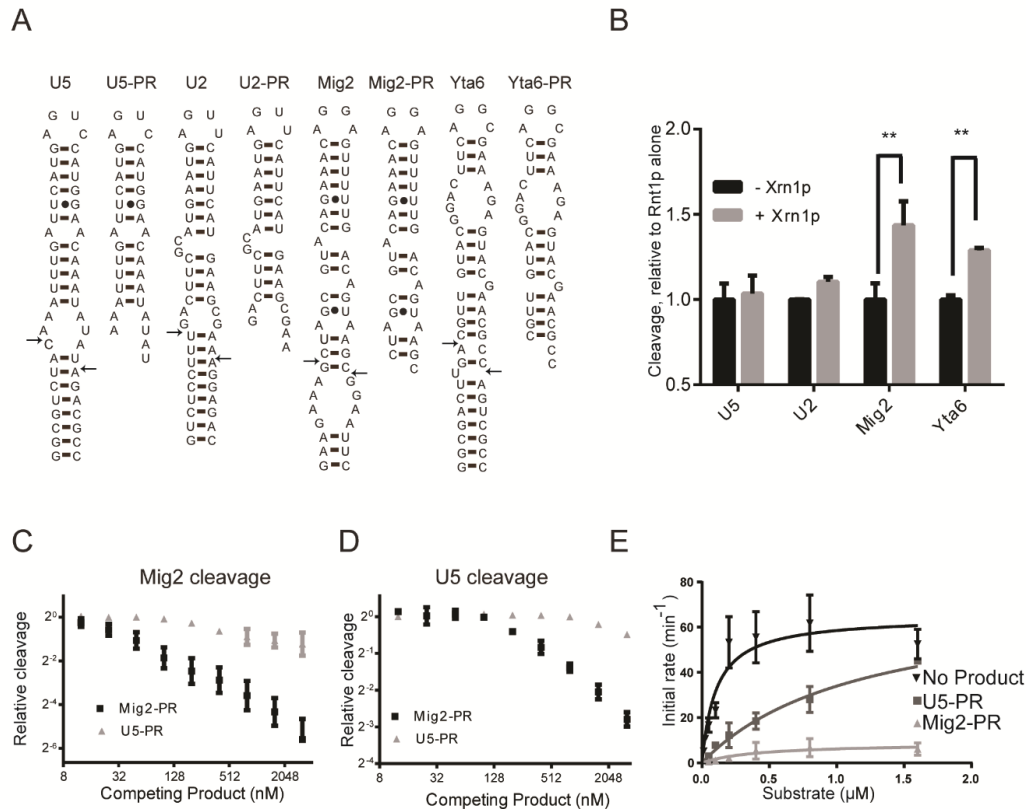


Figure 3: Product inhibition dictates the reactivity of natural mRNA degradation signals.

A) Schematic representation of 4 natural Rnt1p cleavage targets. The substrates and products derived from 2 processing signals (U5 snRNA and U2 snRNA) and 2 degradation signals (Mig2 and Yta6 mRNAs) are shown. The arrows indicate the position of the established cleavage sites. B) Product removal enhances the reactivity of mRNA-associated cleavage signals. An rnt1p cleavage assay was performed and the amount of cleaved substrate was determined in the presence (+ Xrn1) or the absence (- Xrn1) of the exoribonuclease Xrn1p. Asterisks indicates significant difference between treatments (p -value < 0.01). C) Effects of Rnt1p cleavage products on the cleavage of Mig2 mRNA degradation signal. The cleavage of stem-loops derived from Mig2 mRNA was performed in the absence or the presence of increasing amounts of RNA products derived from Mig2 (Mig2-PR) or U5 (U5-PR). D) Effects of Rnt1p cleavage products on the U5 snRNA processing. The cleavage of stem-loops derived from the U5 snRNA 3' end was performed as described in 3C in the absence or presence of increasing amounts of RNA products derived from Mig2 (Mig2-PR) or U5 (U5-PR). E) Kinetics of inhibition by U5 and Mig2 products. Michaelis-Menten curve of the TL substrate (Figure 2A) in the presence (U5PR or Mig2PR) or the absence (ND) of U5 or Mig2 products. The experiments shown are the average of 3 experiments and standard deviations are illustrated in the form of error bars.

1

2 **The turnover of Rnt1p substrates is modulated at the product release step**

3

4 To examine the mechanism by which cleavage products inhibit Rnt1p reactivity, we
5 compared the association (On) and dissociation (Off) rates of the inhibitory (Mig2-PR)
6 and non-inhibitory (U5-PR) products, and their respective substrates, using plasmon
7 resonance. As indicated in Figure 4A, the highly reactive U5 substrate had faster
8 association and dissociation rates than, the moderately reactive substrate, Mig2.
9 These results suggest that the Rnt1p-U5 catalytic complex has faster association and
10 dissociation rates than the Rnt1p-Mig2 complex. Comparison between the association
11 and dissociation kinetics of Mig2 and U5 products indicated that Mig2 products have
12 a two-fold higher association rate (Figure 4C) and an eight-fold lower dissociation rate
13 (Figure 4D). Comparison between the association and dissociation kinetics of the two
14 substrates and their respective products indicated that while both the uncleaved U5
15 substrate and its product have similar affinity, the Mig2 product associates ~1.3-fold
16 faster and dissociates ~6.4-fold slower than its substrate (Figures 4C and 4D). These
17 results indicate that the difference between U5 and Mig2 turnover is mostly the result
18 of the low dissociation rate of the Mig2 cleavage product.

19

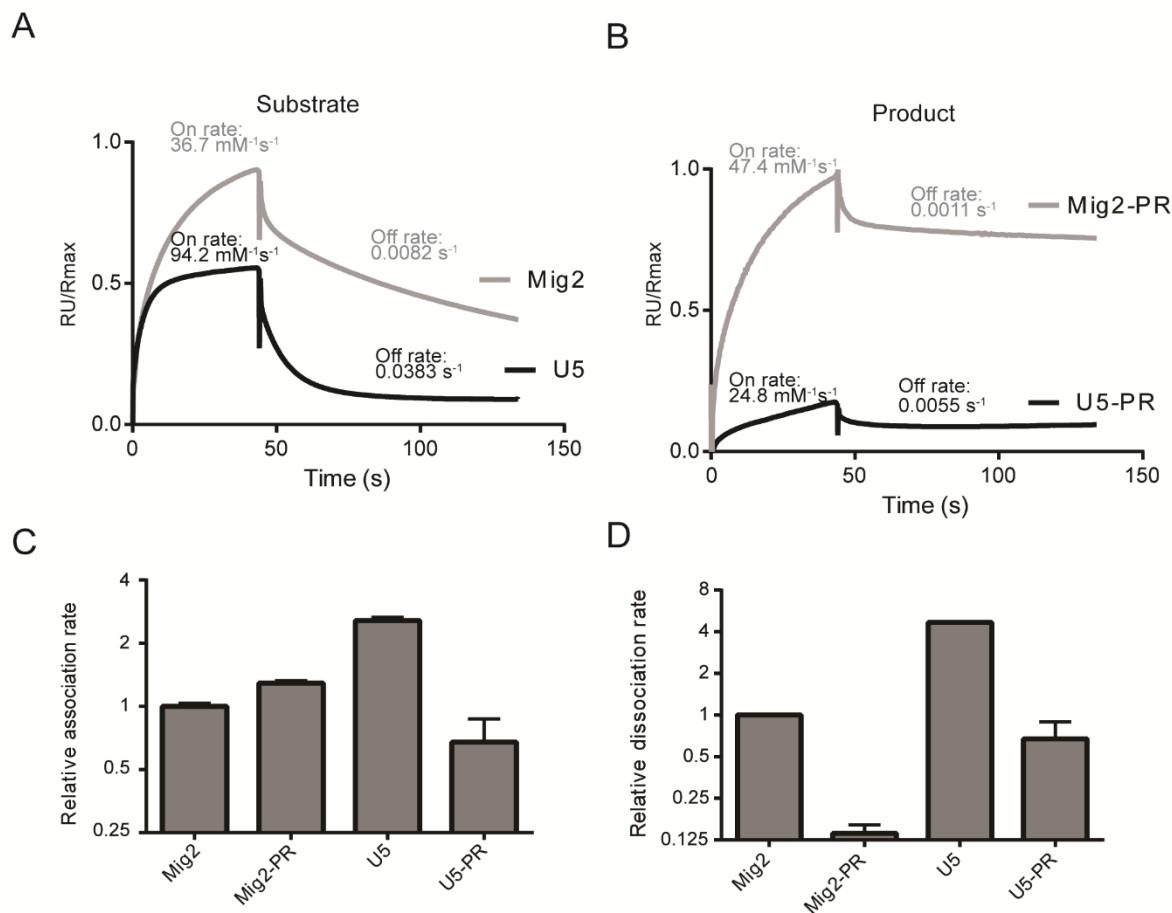


Figure 4: Product release step determined the reactivity of Rnt1p substrates.

A) Comparison between the association and dissociation kinetics of Mig2 (grey) and U5 (black) substrates. Rnt1p association and dissociation rates were determined using surface plasmon resonance in the presence of 10 mM Mg^{2+} and 150 mM KCl. The association and dissociation rates are indicated above each curve, as determined with a one site binding model using curves from concentrations of RNA from 50 nM to 1600 nM. B) Comparison between the association and dissociation kinetics of Mig2 and U5 cleavage products. The association and dissociation rates were calculated as described in A and are indicated above each curve. C) Comparison between the association rates of the substrate and products derived from Mig2 mRNA and U5 snRNA. D) Comparison between the dissociation rates of the substrate and products derived from Mig2 mRNA and U5 snRNA. In C and D the association and dissociation kinetics obtained in A and B were calculated relative to that of Mig2 and are presented in the form of a bar graph with standard errors illustrated as error bars.

1

2 **Identification of Rnt1p substrate reactivity determinants**

3

4 To identify the specific sequence or structural features controlling Rnt1p substrate
5 reactivity, we next compared the stem-loop structure of substrates with high (e.g., U5)
6 versus low (e.g., Mig2) turnover rates. As indicated in Figure 5A, the Mig2 cleavage
7 signal contains more paired nucleotides near the cleavage site and more
8 asymmetrical bulges than that of U5. To evaluate the effect of the structure
9 surrounding the cleavage site on Rnt1p reactivity, we created chimeric substrates
10 composed of either the upper stem-loop of U5 fused to Mig2 cleavage site (U5-CMig2)
11 or the upper stem-loop of Mig2 fused to U5 cleavage site (Mig2-CU5) and compared
12 them to the original natural substrates. Interestingly, we found that the inclusion of the
13 Mig2 cleavage site into the U5 structure (U5-CMig2) inhibited its cleavage by Rnt1p
14 while the inclusion of the U5 cleavage site into the Mig2 substrate (Mig2-CU5)
15 increased cleavage (Figure 5B). This indicates that the difference in processing
16 between the U5 and Mig2 substrates is mainly caused by variations in the nature of
17 the sequence surrounding the cleavage site. To evaluate the impact of the sequence
18 surrounding Mig2 cleavage site on the capacity of the products to inhibit Rnt1p
19 cleavage, we compared the effects of chimeric cleavage products that contain the
20 Mig2 stem linked to the sequence upstream of the U5 cleavage site (Mig2-CU5-PR)
21 to the unmodified Mig2 (Mig2-PR) and U5 (U5-PR) products on the cleavage of the
22 Mig2 substrate. As shown in Figure 5C, the addition of the Mig2-PR inhibited Rnt1p
23 reactivity while the addition of U5-PR or Mig2-CU5-PR had no effect.

24

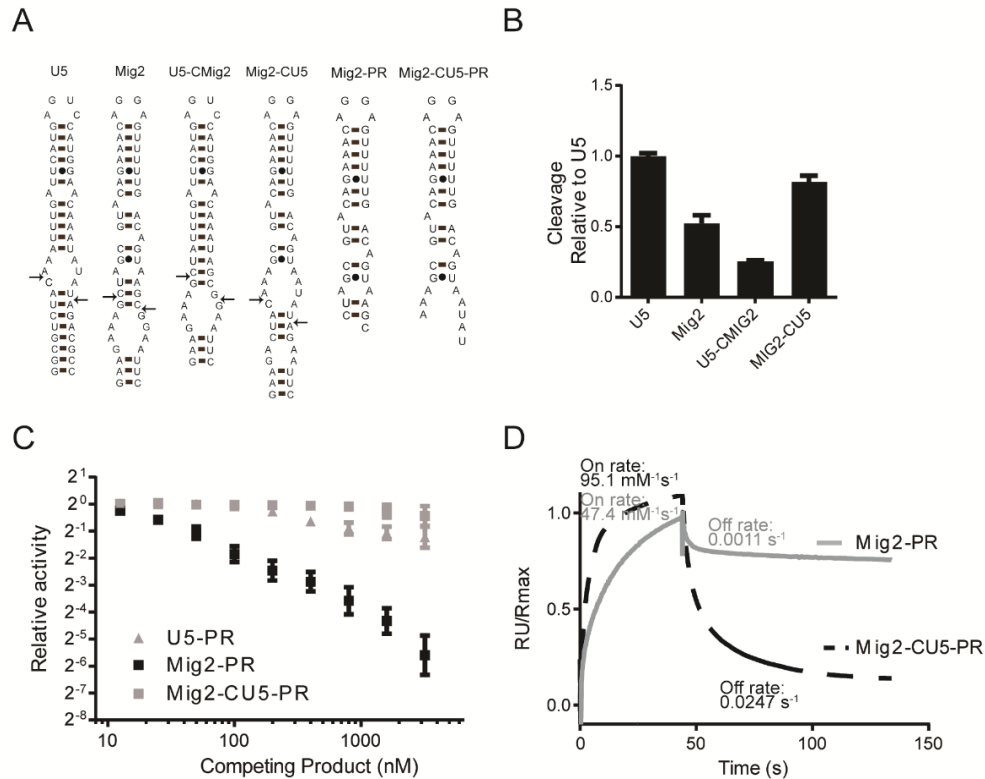


Figure 5: Identification of reactivity determinants near Rnt1p cleavage site.

A) Structure of chimeric U5 and Mig2 RNAs carrying mixed features of U5 and Mig2. U5 and Mig2 indicate the structure of natural U5 and Mig2 substrates. U5-CMig2 indicates a hybrid U5 substrate that carries the sequence of Mig2 surrounding cleavage site, while U5-CMig2-PR indicates the corresponding product after Rnt1p cleavage. Mig2-CU5 is a hybrid between Mig2 substrate and the sequence of U5 surrounding the cleavage site and Mig2-CU5-PR indicates the corresponding product after Rnt1p cleavage. B) The structure surrounding the Mig2 cleavage site is sufficient for the inhibition of Rnt1p reactivity. The different substrates shown in A were assayed for cleavage by Rnt1p as described in Figure 3B and cleavage rates, relative to that obtained with the natural U5 substrate, are represented in the form of a bar graph. The data shown are the average of three independent experiments and the standard deviations are shown in the form of error bars. C) The sequence surrounding the Mig2 cleavage site inhibits Rnt1p reactivity. The cleavage of Mig2 RNA was conducted with increasing amounts of oligonucleotides corresponding to Mig2, U5 or hybrid Mig2-CU5 products and the impact on cleavage for each product is reported in the graph. D) The cleavage efficiency box determines the product binding and release rates. Comparison between the binding kinetics of the Mig2 product (Mig2-PR) and those of Mig2 product with the cleavage efficiency box of U5 (Mig2-CU5-PR). Association and dissociation rates were determined as in figure 4 and are indicated above each graph.

1 In addition, the replacement of the Mig2 sequence surrounding the cleavage site with
2 that of U5 reduced the enzyme's affinity by drastically increasing the dissociation rates
3 of the Mig2 product (Figure 5D). This indicates that the sequence surrounding Mig2
4 cleavage site specifically reduces the turnover rate by decreasing the rate of product
5 release. We conclude that the reactivity of Rnt1p substrate reactivity is defined by
6 determinants near the scissile bonds.

7

8 **The reactivity of Rnt1p substrates is defined by the base-pairing of the cleavage**
9 **site**

10

11 An obvious structural difference between Mig2 and U5 cleavage sites, which
12 determines the nature of product termini, is the number of upstream paired nucleotides
13 (Figure 6A). The termini of the U5 cleavage products are unpaired while those
14 generated by Mig2 feature two terminal base-pairs (Figure 5A). To evaluate the impact
15 of product termini base pairs on the inhibition of Rnt1p cleavage activity, we
16 systematically mutated unpaired nucleotides in the U5 stem and tested the resulting
17 substrates using Rnt1p cleavage assays in the presence or absence of Xrn1p. These
18 experiments were designed to distinguish product-specific inhibition effects from other
19 unrelated variations in substrate reactivity. As expected, only base pairs near the U5
20 cleavage site affected cleavage by Rnt1p in the presence of Xrn1p (Figure 6B).

21

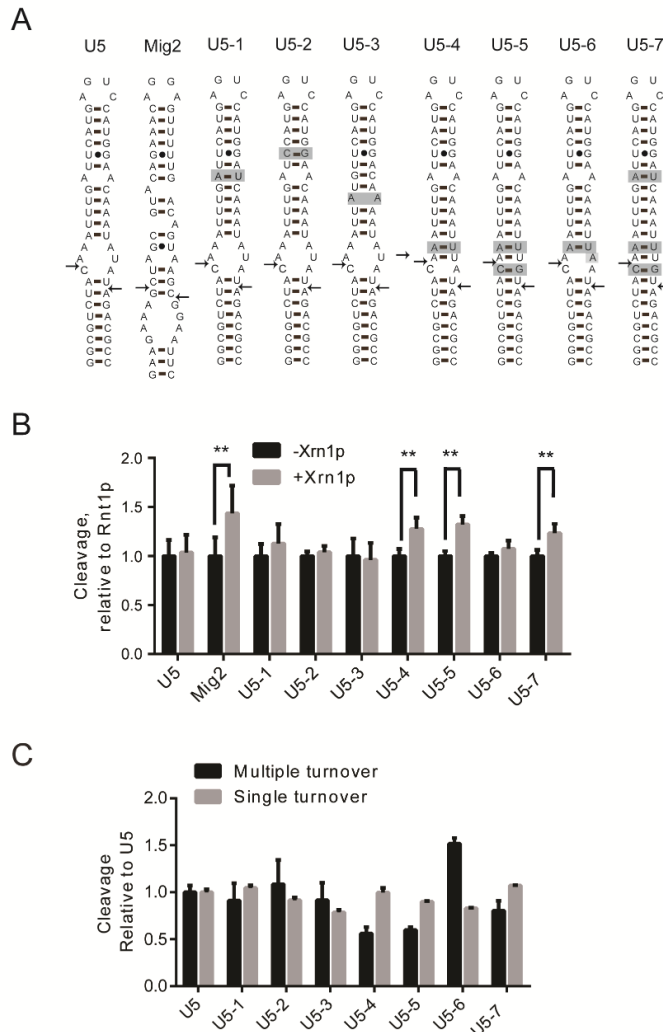


Figure 6: Rnt1p reactivity is modulated by the number of base-pairs upstream of the cleavage site.

A) Structure of U5 snRNA derivatives carrying mutations at unpaired sequences. U5 and Mig2 indicate the structure of U5 snRNA and Mig2 mRNA. U5-1, U5-2, U5-3, U5-4, U5-5, U5-6 and U5-7 indicate mutations in the U5 stem loops. The mutated sites are shaded and the cleavage sites are indicated with arrows. B) Effect of base pairing on the product-dependent inhibition of RNA reactivity. The cleavage reaction of each substrate was carried out as described in Figure 3B in the presence and in the absence of Xrn1p. The data are the average of at least three independent experiments. The asterisks indicate statistically significant differences (p -value < 0.01) in cleavage in comparison to the reaction in absence of Xrn1p. C) Base pairing near the cleavage efficiency box reduces U5 turnover rate. The cleavage of the different versions of U5 substrates were carried as described in Figure 5B under both single and multiple turnover conditions and the different rates presented relative to that of U5.

1 The introduction of the two base pairs immediately upstream of the cleavage site
2 (substrates U5-4, U5-5 and U5-7) affected the cleavage by Rnt1p in the presence of
3 Xrn1p (Figure 6B) and reduced the cleavage rate under multiple-turnover conditions
4 without affecting cleavage activity under single-turnover conditions (Figure 6C).
5 Mutations that created base pairs away from the cleavage site did not affect substrate
6 cleavage by Rnt1p in the presence of Xrn1p (Figures 6B and 6C). This suggests that
7 only base pairs located close to the cleavage site influence the steady state cleavage
8 rate of Rnt1p.

9

10 Next we used our fluorescent assays to examine the role of base pairing near the
11 Rnt1p cleavage site (Figure 1B). Fluorescent substrates with fully or partially
12 complementary paired strands (Figure 7A) were assayed for Rnt1p-mediated
13 cleavage. As shown in Figure 7B, introducing base pair mismatches upstream of the
14 cleavage site disrupted the biphasic pattern observed in Rnt1p cleavage reaction and
15 increased the steady-state turnover rate. We thus conclude that the reactivity of Rnt1p
16 is modulated by the number of base pairs upstream of the cleavage site.

17

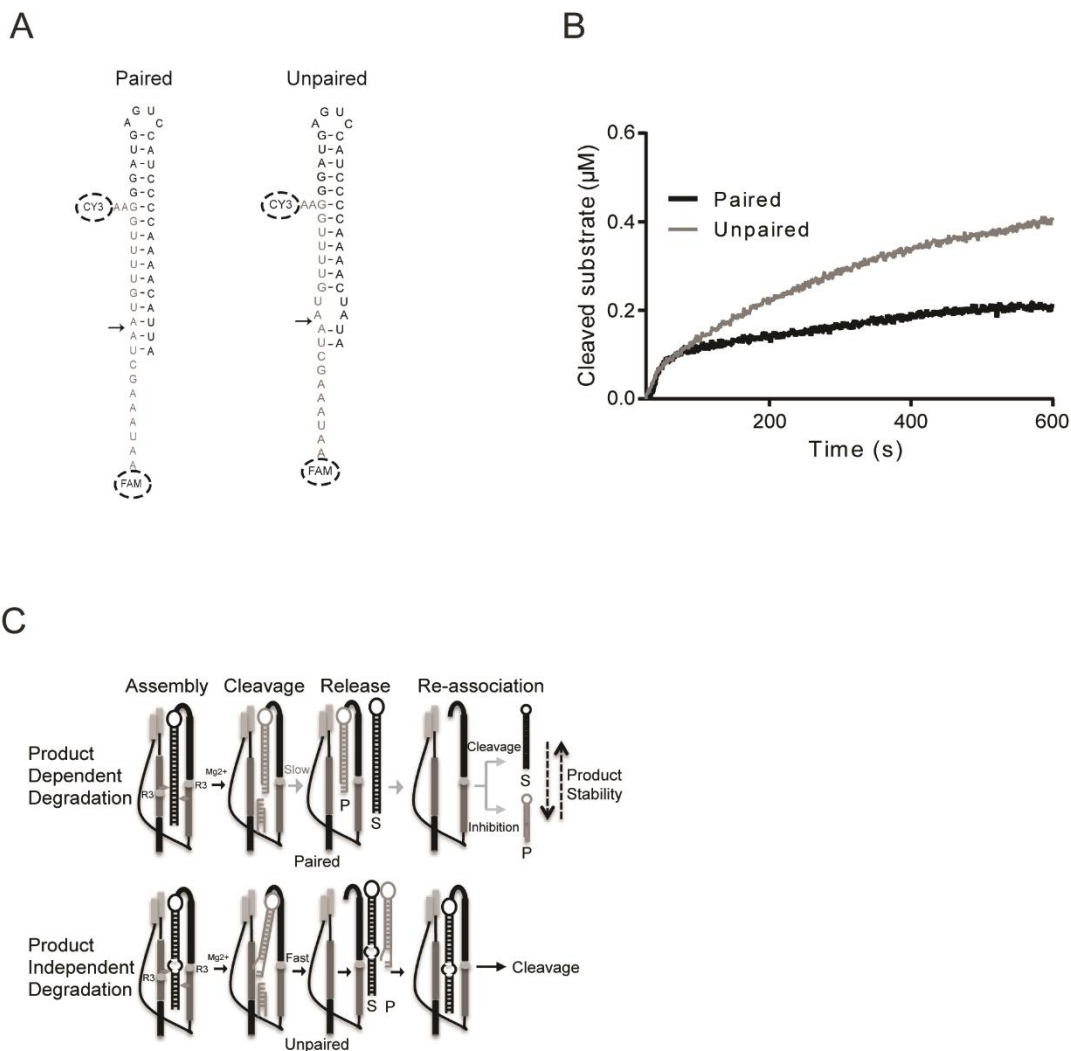


Figure 7: Pairing near the cleavage efficiency box modifies the rate of Rnt1p cleavage.

A) Structures of fluorescently labeled Rnt1p substrates with different pairing configurations near the cleavage site. B) Cleavage profiles of substrates with different pairings at the cleavage site. The cleavage of fluorescent substrates was conducted as described in Figure 2D. C) Mechanism of substrate encoded modulation of enzymatic reactivity. The model illustrates how the structure of Rnt1p substrates influences the reactivity depending on the stability of the cleavage product. In this model, substrates with strong base-pairing near the cleavage site (e.g. mRNAs) undergo a product-dependent degradation reaction, where the reactivity is controlled by the rate of product release and association. On the other hand, substrates with unpaired nucleotides near the cleavage sites are cleaved irrespective of product levels and quickly released.

1

2 **DISCUSSION**

3

4 This study describes the mechanism by which RNase III distinguishes between the
5 substrates and the cleavage products and provides an explanation for how the
6 enzyme's activity is modulated to control expression of transcripts with different
7 biological functions. Comparison between the substrates and the products of Rnt1p
8 indicates that most of the enzyme's RNA-binding domains remain bound after
9 cleavage, the exception being the RBM3 RNA-binding motif (Figure 1A). RBM3 binds
10 to the substrate by interacting with 4 base pairs, two upstream and two downstream
11 of the cleavage site, and only the two base pairs upstream of the cleavage site remain
12 unaffected after cleavage. Disruption of these upstream base pairs increased the
13 dissociation rate of the RNA, suggesting that dissociation from RBM3 triggers
14 definitive product release (Figures 4 and 5). Consistently, increasing the number of
15 base pairs upstream of the cleavage site increases the capacity of the products to
16 inhibit Rnt1p, leading to the modulation of the cleavage rate after the first round of
17 cleavage.

18

19 A previous study monitoring the intrinsic fluorescence of bacterial RNase III during
20 catalysis indicated that the turnover rate is limited by a step subsequent to RNA
21 hydrolysis, which was presumed to be either the product release step, or a change in
22 the protein conformation after catalysis (36). Comparison between the structures of
23 the catalytic and post-catalytic complexes of bacterial RNase III revealed that the RNA
24 is distorted during cleavage and that its release from the catalytic site occurs in two
25 steps which both require minor rearrangements in protein conformation (26,37,38).
26 Consistently, our real time analysis of Rnt1p catalysis indicated a two-step process in
27 which the product release is the rate-limiting step in the steady-state turnover rate

(Figures 1 and 2). Indeed, comparison between the binding kinetics of different products shows that slow dissociation rate is an intrinsic feature of products that inhibit Rnt1p cleavage reaction (Figure 4). Product-dependent inhibition of RNase III enzymes likely arises from the high similarity between the products and the substrates; in most cases the cleavage products of this enzyme family retain affinity for the enzyme (2,23). This similarity is most clear in the case of Rnt1p, where most of protein interaction sites with the RNA are maintained in the product (Figure 1A). In bacterial RNase III, the dsRBD binds the RNA in the same region as the catalytic domain (26,37), while the dsRBD of Rnt1p binds to the tetraloop and its neighbouring stem structure (22). This unique mode of binding permits stable association with cleavage products and with short stems lacking the cleavage site (32). Therefore, while rate-limiting product release might be a general feature of RNase III, its impact is amplified in enzymes with special recognition mechanisms, like Rnt1p, where the RBM0 domain recognizes the tetraloop, and Dicer, where the PAZ domain specifically recognizes the two nucleotide 3' overhang at the end of a hairpin structure (39).

In eukaryotes, RNA transcription and processing or degradation are well integrated processes involving many factors. In yeast, it was shown that Rnt1p processes rRNA (40) and degrades a subset of its mRNA targets cotranscriptionally (41,42). After *in vivo* cleavage, Rnt1p products are exposed to downstream helicases and exoribonuclease that can eliminate free cleavage products (16,43). These observations suggest that the products would not be able to play a role in modulating Rnt1p activity. Surprisingly we found *in vitro* that the product release, which is not affected by external factors, plays an important role in defining substrate reactivity. Product release limits the cleavage of conditionally degraded mRNA substrates like Mig2, which is regulated in a glucose dependent manner (9), due to substrate-specific base pairing upstream of cleavage sites (Figures 5 and 7). Consistently, secondary structure comparison of hundreds of newly discovered Rnt1p substrates indicated that the sequence near the cleavage site is preferentially unpaired in non-coding RNAs

1 that are cleaved efficiently by Rnt1p (10) . Therefore, it appears that non-coding RNA
2 substrates have evolved to avoid product inhibition.

3
4 Together the data presented in this study suggest a mechanism for two modes of RNA
5 cleavage that depends on the nature of the substrate (Figure 7C). In the case of highly
6 reactive RNA processing substrates, the assembly occurs readily and produces
7 cleavage products with unpaired ends. This destabilizes the catalytic complex and
8 triggers efficient product release, allowing the enzyme to be available for another
9 round of catalysis. In this mode, the turnover rate reflects the catalytic rate and the
10 efficient cleavage of an unlimited number of substrates can take place without the
11 need to modify or degrade the products. In contrast, the degradation of less reactive
12 regulated mRNA is product-dependent and has slower association and dissociation
13 rates. In this mode of cleavage, the product release slows down the turnover rate and
14 the accumulating product can compete with the substrates in the absence of factors
15 that modulate product stability or structure.

16 17 **SUPPLEMENTARY DATA**

18
19 Supplementary Data are available at NAR online.

20 21 **FUNDING**

22
23 This work was supported by the Canadian Institute of Health Research and the
24 Canada Research Chair in RNA Biology and Cancer Genomics (S. A). Funding for
25 open access charge was provided by the Canadian Institute of Health Research. The

1 funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish,
2 or preparation of the manuscript.

3

4 **ACKNOWLEDGMENTS**

5

6 We thank Ute Kothe and members of the Abou Elela laboratory for critical reading of
7 the manuscript.

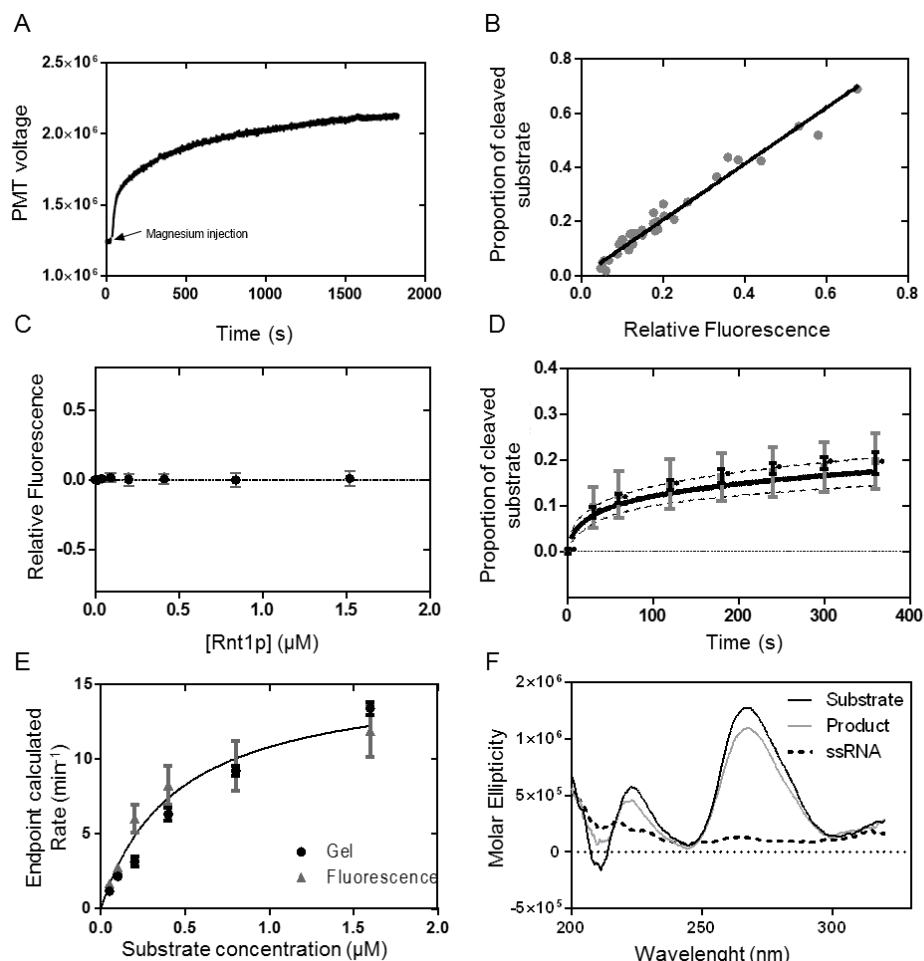
8

1

Supplemental Information

2

1



2

3 **Figure S1, related to figure 1:**

4 Validation of Rnt1p fluorescence cleavage assay. A) A typical fluorescence curve obtained
 5 during cleavage assays. B) Correlation between the fluorescent signal and the proportion of
 6 cleaved substrate. The endpoint fluorescence level was directly compared to the proportion
 7 of cleaved RNA resolved on gel. C) Rnt1p does not affect fluorescence of the substrate in the
 8 absence of magnesium. Increasing amount of Rnt1p was added to the substrate in the
 9 absence of magnesium and the changes in the substrate fluorescence was calculated and
 10 presented in the form of point graph. D) Comparison between the cleavage time courses
 11 obtained using fluorescence (black line) or gels based assays (grey). The data shown is an
 12 average of three independent experiments and the variations indicated by error bars and
 13 dotted lines. E) Comparison between the cleavage kinetics obtained by fluorescence and
 14 assays resolved on gel after a three minute incubation. F) Helicity of the RNA substrate and
 15 product measured by circular dichroism.

16

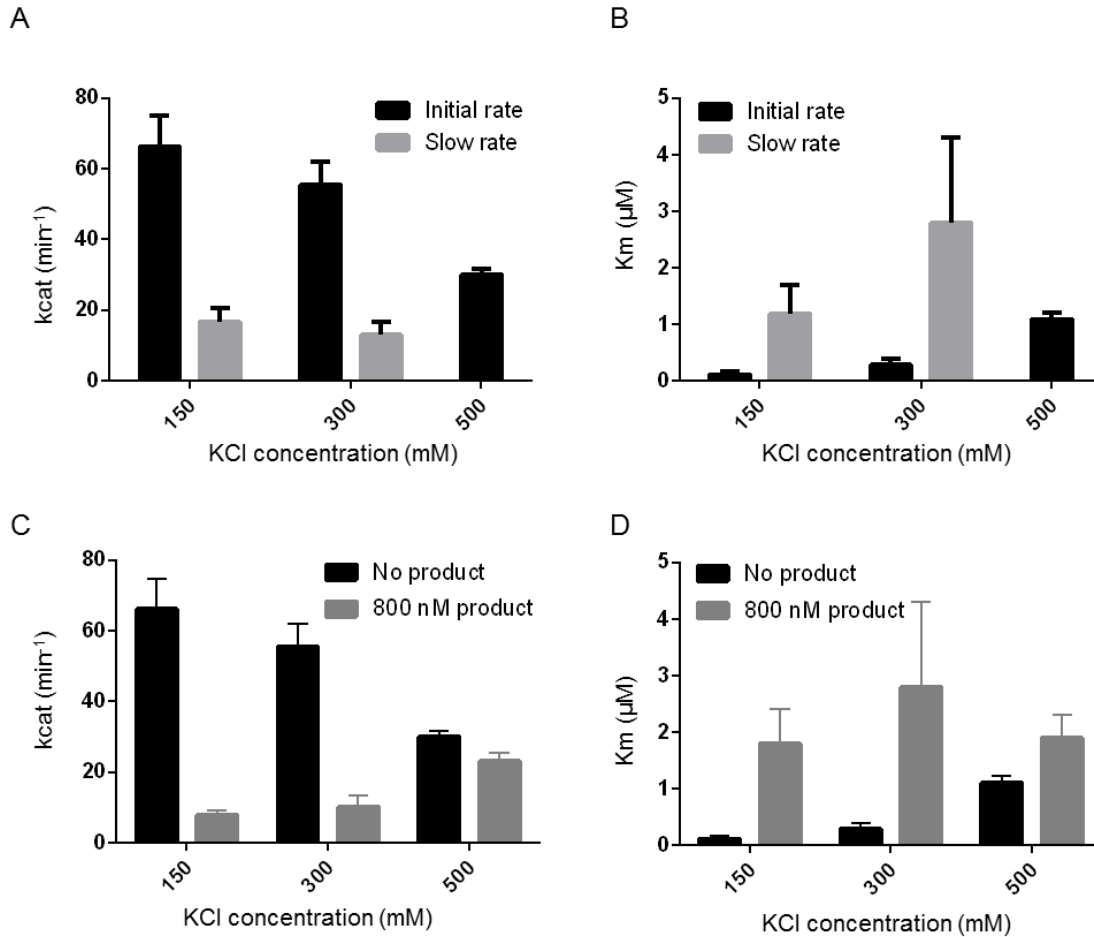


Figure S2, related to figure 2:

The cleavage products inhibit Rnt1p turnover in monovalent salt sensitive manner. A) and B) Impact of monovalent salt concentrations on Rnt1p cleavage kinetics. The kinetic parameters were calculated with michaelis menten model using rates obtained by real time fluorescence assay in a buffer containing 150, 300 and 500 mM KCl. The impact on the kcat (A) and the Km (B) of each phase of the reaction are represented as bar graphs. Curves done at 500 mM KCl concentration were best fitted to a single phase model where only one phase is present. C and D) Effect of KCl on product inhibition. The Kinetic parameters were calculated in the presence of 800 nM of RNA products in a buffer containing 150, 300 and 500 mM KCl. The impact on the observed kcat (C) and the observed Km (D) of the initial phase of reaction are represented as bar graphs.

1

2 **Supplementary table 1:**

3 Compilation of kinetic parameter calculated for the fluorescent substrate in this study.

Monovalent salt	Product	Rate	kcat (min ⁻¹)	Km (μM)
150 mM	0	initial	64.7 ± 5.8	0.11 ± 0.04
150 mM	0	slow	10.1 ± 1.2	0.51 ± 0.17
300 mM	0	initial	55.6 ± 6.4	0.29 ± 0.1
300 mM	0	slow	11.8 ± 3.6	2.9 ± 1.6
500 mM	0	initial	30.1 ± 1.5	1.1 ± 0.12
150 mM	800 nM	initial	12.4 ± 4.8	2.2 ± 1.5
300 mM	800 nM	initial	10.2 ± 3.3	2.8 ± 1.5
500 mM	800 nM	initial	23.1 ± 2.3	1.9 ± 0.4
150 mM	800 nM U5-PR	initial	62.2 ± 12	0.65 ± 0.26
150 mM	800 nM Mig2-PR	initial	9.0 ± 2.8	0.5 ± 0.3

4

5

6

1 REFERENCES

- 2 1. Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J. and Abou Elela, S. (2001) The
3 RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic
4 dsRNA metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **3**, 71-78.
- 5 2. Nicholson, A.W. (2014) Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA
6 cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **5**, 31-48.
- 7 3. Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He,
8 X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K. *et al.* (1997) MIC-1, a
9 novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta
10 superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 11514-11519.
- 11 4. Ji, X. (2008) The mechanism of RNase III action: how dicer dices. *Curr. Top.*
12 *Microbiol. Immunol.*, **320**, 99-116.
- 13 5. St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. and Jantsch, M. (1992) A conserved
14 double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**,
15 10979-10983.
- 16 6. Robertson, H.D., Webster, R.E. and Zinder, N.D. (1968) Purification and
17 properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 82-91.
- 18 7. Danin-Kreiselman, M., Lee, C.Y. and Chanfreau, G. (2003) RNase III-mediated
19 degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol. Cell*, **11**, 1279-
20 1289.
- 21 8. Ghazal, G., Ge, D., Gervais-Bird, J., Gagnon, J. and Abou Elela, S. (2005)
22 Genome-wide prediction and analysis of yeast RNase III-dependent snoRNA
23 processing signals. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2981-2994.
- 24 9. Ge, D., Lamontagne, B. and Abou Elela, S. (2005) RNase III-Mediated
25 Silencing of a Glucose-Dependent Repressor in Yeast. *Curr. Biol.*, **15**, 140-145.
- 26 10. Gagnon, J., Lavoie, M., Catala, M., Malenfant, F. and Elela, S.A. (2015)
27 Transcriptome wide annotation of eukaryotic RNase III reactivity and
28 degradation signals. *PLoS Genet*, **11**, e1005000.

- 1 11. Catala, M., Aksouh, L. and Abou Elela, S. (2012) RNA-dependent regulation of
2 the cell wall stress response. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7507-7517.
- 3 12. Abou Elela, S. and Ares, M., Jr. (1998) Depletion of yeast RNase III blocks
4 correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2
5 snRNA. *EMBO J.*, **17**, 3738-3746.
- 6 13. Chanfreau, G., Abou Elela, S., Ares, M., Jr. and Guthrie, C. (1997) Alternative
7 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.*, **11**, 2741-2751.
- 8 14. Seipelt, R.L., Zheng, B., Asuru, A. and Rymond, B.C. (1999) U1 snRNA is
9 cleaved by RNase III and processed through an Sm site- dependent pathway.
10 *Nucleic Acids Res.*, **27**, 587-595.
- 11 15. Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey,
12 D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis.
13 *EMBO J.*, **18**, 5399-5410.
- 14 16. Ghazal, G. and Elela, S.A. (2006) Characterization of the reactivity
15 determinants of a novel hairpin substrate of yeast RNase III. *J. Mol. Biol.*, **363**,
16 332-344.
- 17 17. Abou Elela, S., Igel, H. and Ares, M., Jr. (1996) RNase III cleaves eukaryotic
18 preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell*, **85**, 115-124.
- 19 18. Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R.J. and Elela,
20 S.A. (2007) RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *J. Biol.*
21 *Chem.*, **282**, 4373-4381.
- 22 19. Meaux, S., Lavoie, M., Gagnon, J., Abou Elela, S. and van Hoof, A. (2011)
23 Reporter mRNAs cleaved by Rnt1p are exported and degraded in the
24 cytoplasm. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9357-9367.
- 25 20. Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S. and Fourmy, D.
26 (2001) Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p
27 RNA processing. *EMBO J.*, **20**, 7250-7258.

- 1 21. Lavoie, M. and Abou Elela, S. (2008) Yeast ribonuclease III uses a network of
2 multiple hydrogen bonds for RNA binding and cleavage. *Biochemistry (Mosc).*
3 **47**, 8514-8526.
- 4 22. Liang, Y.H., Lavoie, M., Comeau, M.A., Abou Elela, S. and Ji, X. (2014)
5 Structure of a Eukaryotic RNase III Postcleavage Complex Reveals a Double-
6 Ruler Mechanism for Substrate Selection. *Mol. Cell*.
- 7 23. Lamontagne, B. and Abou Elela, S. (2004) Evaluation of the RNA determinants
8 for bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J. Biol. Chem.*, **279**,
9 2231-2241.
- 10 24. Lamontagne, B., Ghazal, G., Lebars, I., Yoshizawa, S., Fourmy, D. and Abou
11 Elela, S. (2003) Sequence dependence of substrate recognition and cleavage
12 by yeast RNase III. *J. Mol. Biol.*, **327**, 985-1000.
- 13 25. Lamontagne, B., Tremblay, A. and Abou Elela, S. (2000) The N-terminal
14 domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a
15 dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol.*
16 *Cell. Biol.*, **20**, 1104-1115.
- 17 26. Blaszczyk, J., Gan, J., Tropea, J.E., Court, D.L., Waugh, D.S. and Ji, X. (2004)
18 Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure*
19 *(Camb)*, **12**, 457-466.
- 20 27. Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunencko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S.,
21 Court, D.L. and Ji, X. (2001) Crystallographic and modeling studies of RNase
22 III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure (Camb)*,
23 **9**, 1225-1236.
- 24 28. Lamontagne, B., Hannoush, R.N., Damha, M.J. and Abou Elela, S. (2004)
25 Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic
26 RNase III: discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast
27 Rnt1p. *J. Mol. Biol.*, **338**, 401-418.
- 28 29. Lamontagne, B. and Abou Elela, S. (2001) *Purification and characterization of*
29 *Saccharomyces cerevisiae Rnt1p nuclease*. Academic Press, San diego, CA.

- 1 30. Purich, D. (2010) *Enzyme Kinetics*. Elsevier.
- 2 31. Pellegrini, O., Mathy, N., Condon, C. and Benard, L. (2008) In vitro assays of
3 5' to 3'-exoribonuclease activity. *Methods Enzymol.*, **448**, 167-183.
- 4 32. Lamontagne, B. and Abou Elela, S. (2007) Short RNA guides cleavage by
5 eukaryotic RNase III. *PLoS One*, **2**, e472.
- 6 33. Lilley, D.M. (2009) The structure and folding of branched RNA analyzed by
7 fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.*, **469**, 159-187.
- 8 34. Larimer, F.W., Hsu, C.L., Maupin, M.K. and Stevens, A. (1992)
9 Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'-->3' exoribonuclease:
10 sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-
11 disrupted yeast cells. *Gene*, **120**, 51-57.
- 12 35. Schnall, R., Mannhaupt, G., Stucka, R., Tauer, R., Ehnle, S., Schwarzlose, C.,
13 Vetter, I. and Feldmann, H. (1994) Identification of a set of yeast genes coding
14 for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the
15 26S protease complex. *Yeast*, **10**, 1141-1155.
- 16 36. Campbell, F.E., Jr., Cassano, A.G., Anderson, V.E. and Harris, M.E. (2002)
17 Pre-steady-state and stopped-flow fluorescence analysis of Escherichia coli
18 ribonuclease III: insights into mechanism and conformational changes
19 associated with binding and catalysis. *J. Mol. Biol.*, **317**, 21-40.
- 20 37. Gan, J., Tropea, J.E., Austin, B.P., Court, D.L., Waugh, D.S. and Ji, X. (2006)
21 Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by
22 ribonuclease III. *Cell*, **124**, 355-366.
- 23 38. Gan, J., Shaw, G., Tropea, J.E., Waugh, D.S., Court, D.L. and Ji, X. (2008) A
24 stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Mol.*
25 *Microbiol.*, **67**, 143-154.
- 26 39. Bergeron, L., Jr., Perreault, J.P. and Abou Elela, S. (2010) Short RNA duplexes
27 guide sequence-dependent cleavage by human Dicer. *RNA*, **16**, 2464-2473.

- 1 40. El Hage, A., Koper, M., Kufel, J. and Tollervey, D. (2008) Efficient termination
2 of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast.
3 *Genes Dev.*, **22**, 1069-1081.
- 4 41. Ghazal, G., Gagnon, J., Jacques, P.E., Landry, J.R., Robert, F. and Elela, S.A.
5 (2009) Yeast RNase III triggers polyadenylation-independent transcription
6 termination. *Mol. Cell*, **36**, 99-109.
- 7 42. Lavoie, M., Ge, D. and Abou Elela, S. (2012) Regulation of conditional gene
8 expression by coupled transcription repression and RNA degradation. *Nucleic
9 Acids Res.*, **40**, 871-883.
- 10 43. Ursic, D., Chinchilla, K., Finkel, J.S. and Culbertson, M.R. (2004) Multiple
11 protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA
12 helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA
13 processing. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2441-2452.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

1. La structure cristalline de Rnt1p révèle un nouveau motif de liaison

Rnt1p est une ribonucléase de type III qui lie l'ARN par l'entremise d'un domaine de liaison à l'ARNdb. Ce domaine est caractérisé par un repliement de type $\alpha\beta\beta\alpha$. Le domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p possède ce repliement mais aussi une séquence supplémentaire dans son extrémité c-terminale (Figure 9A). Celui-ci possède en effet une séquence additionnelle formant deux hélices alpha supplémentaires dans cette région (Figure 9B). Cette extension a pour effet de modifier l'angle de l'hélice alpha-1 afin qu'elle interagisse à la jonction en l'hélice et la boucle de l'ARN. De plus, cette extension donne la possibilité d'effectuer de nouvelles interactions avec l'ARN. La résolution de la structure de Rnt1p a permis de déterminer que les interactions avec l'ARN sont effectuées par 5 motifs de liaison à l'ARN, dont trois sont présents dans le domaine de liaison à l'ARNdb (RBM0,1 et 2). Les études précédentes qui ont porté sur la structure du domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p ont suggéré que la sélection des substrats était effectuée par reconnaissance de la structure du sillon mineur adjacent à la tétraboucle (Wang et al., 2011; Wu et al., 2004). La structure cristalline de Rnt1p en complexe avec un ARN de type NGNN a révélé qu'elle reconnaît spécifiquement la guanine à l'aide d'un nouveau motif de liaison à l'ARN, le RBM0, dénommé « Guanine Clamp » (chapitre 2, (Liang et al., 2014)). Malgré que ce motif fait partie du domaine de liaison à l'ARNdb, il n'a pas été identifié dans les structures déterminées auparavant. La raison majeure est que les expériences de RMN ont été effectuées sur une protéine pour laquelle la séquence en C-terminal n'était pas complète et la structure du RBM0 a été affectée. Le RBM0 complet est composé des résidus 445 à 455. (Figure 9C).

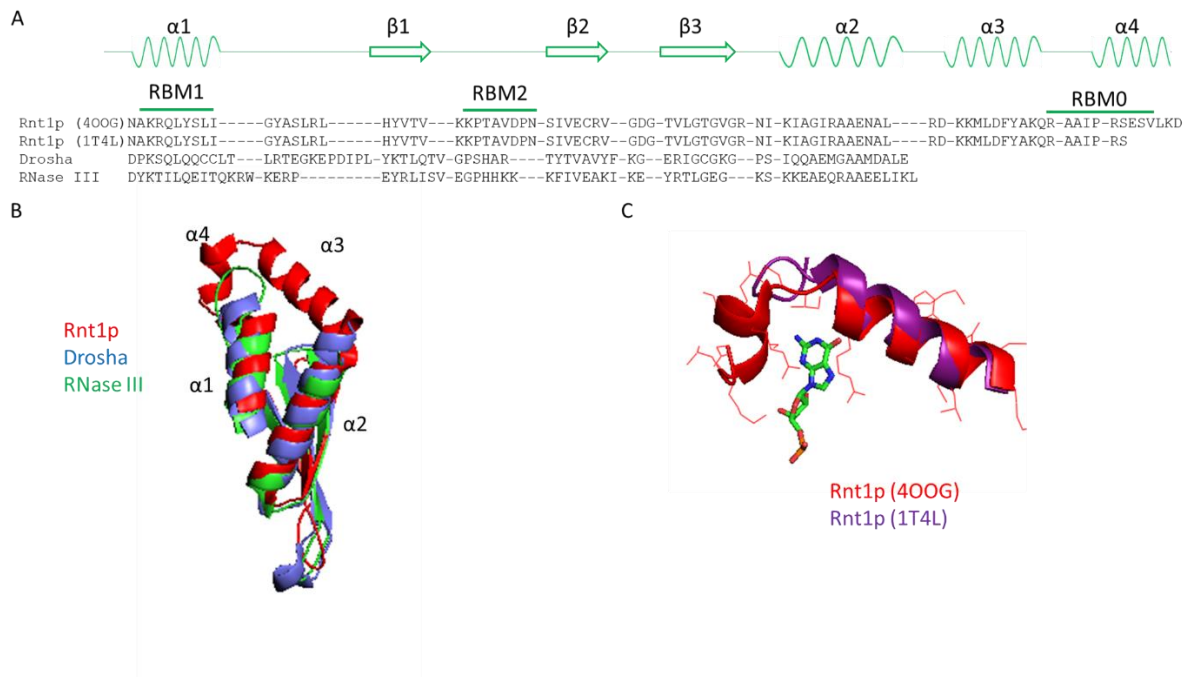


Figure 9 : Le domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p possède deux hélices alpha supplémentaires lui permettant de lier la guanine des tétraboucles de type G2.

A) Comparaison de la séquence et de la structure du domaine de liaison à l'ARNdb de la RNase III bactérienne (RNase III), humaine (Drosha) et de *S.cerevisiae* (Rnt1p). Pour Rnt1p deux séquences sont indiquées, celle de la structure précédemment résolue par RMN et celle utilisée pour la structure cristalline. Le repliement de la protéine et les motifs de liaison à l'ARN (RBM) sont indiqués au dessus des séquences. B) Structure superposée de la RNase III, Rnt1p et Drosha. Les hélices alpha sont indiquées afin de mettre en évidence les deux hélices alpha présente dans le domaine de liaison à l'ARNdb de Rnt1p. C) Comparaison de la structure des hélices 3 et 4 du domaine de liaison à l'ARNdb obtenu par RMN(1T4L) ou par cristallographie (40OG).

2. Rnt1p reconnaît la séquence de la guanine des boucles

La majorité des substrats de Rnt1p identifiés jusqu'à maintenant possèdent une structure d'ARN double brin coiffée d'une tétraboucle dont la deuxième position est un résidu guanosine. Rnt1p effectue sept ponts hydrogènes avec la guanosine de la tétraboucle. Ces interactions sont effectuées majoritairement par le RBM0, mais il y a aussi collaboration du domaine N-terminal et du RBM1 qui contribuent un pont hydrogène chacun (chapitre 2, (Liang et al., 2014)). Quatre ponts hydrogènes sont effectués avec la face Watson-Crick de la guanine ce qui permet une reconnaissance spécifique de celle-ci. Le changement de cette guanine pour d'autres purines a un impact majeur sur l'affinité de Rnt1p pour ces ARN. Comme prévu, la mutation des résidus 445, 450 et 453 ont tous trois eu un impact important sur le clivage et la liaison de Rnt1p à ces ARN. La chaîne latérale de l'arginine 445 forme une interaction avec le phosphate. De plus le lien peptidique entre celle-ci et l'alanine 446 effectue un pont hydrogène avec la face Watson-Crick de la guanine. La mutation de cette arginine abolit le clivage en condition normale suggérant que ce résidu est essentiel à la formation du RBM0 et la reconnaissance de l'ARN par Rnt1p. L'arginine 450 est impliquée dans la formation du RBM0 en interagissant principalement avec le sucre de la guanosine conservée. La mutation de cette arginine en alanine est davantage tolérée que celle de R445 malgré que l'affinité soit réduite d'un facteur 7 et le clivage diminué de 70% dans le cas d'un ARN long (33pb) de type NGNN. La sérine 453 interagit avec la face Watson-Crick de la guanine à l'aide de sa chaîne latérale. La mutation de ce résidu pour une lysine a comme effet de réduire l'affinité d'un facteur 6 et de diminuer le clivage de près de 90%. Malgré que ce résidu n'effectue qu'un seul pont hydrogène avec la guanine, ce résultat indique qu'il s'agit d'une position importante dans la reconnaissance des tétraboucles NGNN. Finalement, le lien peptidique entre l'isoleucine en position 448 et la proline 449 interagit aussi avec la guanine et la mutation de la proline en alanine a aussi un effet délétère sur le clivage et la liaison par Rnt1p, effet qui est cependant moins marqué que les autres mutations

1 étant donné que la chaîne latérale de la proline 449 n'est pas impliquée dans
2 l'interaction avec l'ARN et que la mutation de la proline en alanine n'affecte
3 probablement pas la structure du domaine de manière définitive.

4

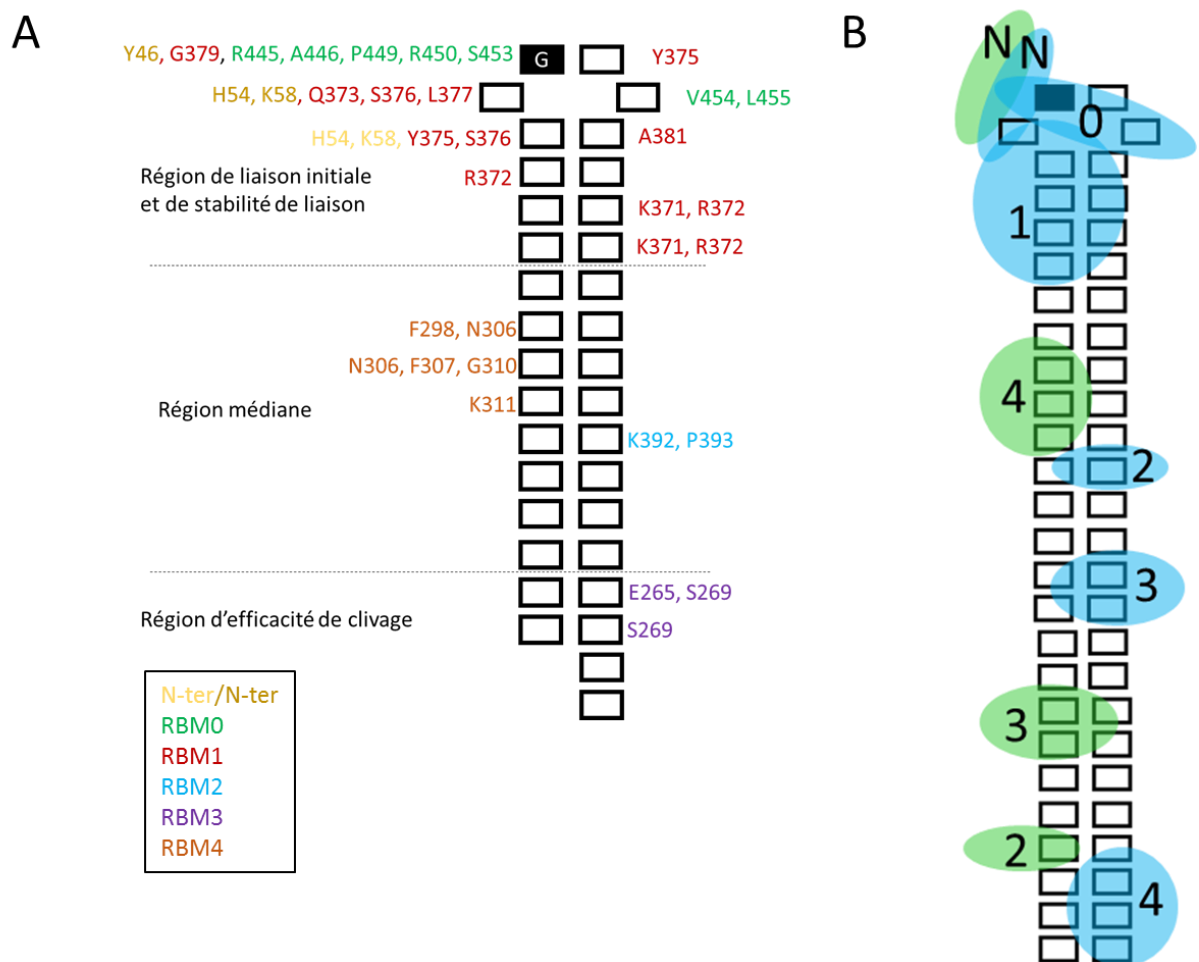
5 De façon inattendue, les mutations des résidus du RBM0 ont aussi eu un effet sur la
6 liaison des ARN de type AAGU (Annexe 1). Ce résultat suggère que le motif RBM0
7 pourrait aussi être impliqué dans la reconnaissance de la guanine en troisième
8 position de la tétraboucle. La conformation du squelette phosphate des tétraboucles
9 AAGU est semblable à celle des tétraboucles NGNN à l'état libre et il est possible que
10 Rnt1p reconnaisse initialement cette structure (Gaudin et al., 2006; Wu et al., 2004).
11 Toutefois la liaison stable avec un ARN possédant une tétraboucle AAGU demande
12 probablement des contacts différents entre la protéine et l'ARN afin de remodeler
13 l'ARN pour charger une guanine disposée à une autre position à l'intérieur du RBM0
14 (Figure 6). Les expériences de protection par Rnt1p des radicaux hydroxyle sur des
15 substrats ont révélé que pour les ARN ayant une boucle AAGU, les trois premières
16 paires de bases ainsi que la position 3 de la boucle seraient davantage protégées que
17 pour les substrats de type NGNN (Ghazal and Elela, 2006). De plus, les données
18 publiées par Mathieu Lavoie (Lavoie and Abou Elela, 2008) ont exploré l'impact des
19 liaisons avec le ribose par substitution 2'-fluoro. Pour l'ensemble des positions de la
20 boucle AAGU, une substitution pour un 2'-fluoro avait comme impact de réduire la
21 réactivité d'environ 50%, ce qui est un impact supérieur à ce qui a été observé pour
22 les substrats de type NGNN. Le clivage des substrats de type AAGU est aussi plus
23 sensible à la délétion du domaine N-terminal, ce qui suggère que ce domaine pourrait
24 aussi être impliqué dans la stabilisation de la liaison de telles boucles. Malgré que les
25 tétraboucles de type NGNN soient le substrat optimal pour Rnt1p, il semble que cette
26 enzyme ait une certaine flexibilité en ce qui concerne la sélection des boucles ayant
27 une guanine et davantage de travaux sur le sujet seront nécessaires pour préciser le
28 mécanisme exact de sélection de ces ARN. L'accessibilité de la guanine au solvant

de manière générale et non seulement la séquence typique NGNN pourrait être impliqué dans la sélection des substrats par Rnt1p.

3. Rnt1p contacte l'ARN sur trois régions

Les études biochimiques précédemment effectuées à notre laboratoire ont divisé les substrats de Rnt1p en deux régions fonctionnelles : la région de liaison initiale et de stabilité de liaison, définie comme étant la tétraboucle NGNN et les 4 premières paires de bases et la région d'efficacité de clivage, définie comme étant les deux paires de bases de chaque côté de chaque site de clivage (Figure 10, (Lamontagne and Elela, 2004)). Les interactions entre Rnt1p et l'ARN permettent de confirmer les interactions exhaustives avec la boucle et les quatre premières paires de bases proximales à celle-ci, interactions qui sont effectuées par les RBM0 et RBM1 (Figure 10). Les deux paires de bases au-dessus du site de clivage sont aussi contactées par le RBM3 du domaine RIID, cette interaction correspond à la région d'efficacité de clivage (Figure 2). Une nouvelle région d'interaction, qui correspond aux paires de bases 7 à 10 est contactée par le RBM2 du dsRBD de la sous-unité du dimère qui contacte la boucle et par le RBM4 du domaine RIID de l'autre sous-unité du dimère (Figure 10). L'interaction par le RBM2 sur l'ARN a déjà été observée dans les structures précédemment obtenues par RMN (Wu et al., 2004) et une protection par Rnt1p des radicaux libre à cet endroit a aussi été observée pour les substrats de type AAGU (Ghazal and Elela, 2006). Toutefois, le rôle précis de cette région n'a pas été identifié par nos caractérisations biochimiques antérieures. La mutation de la lysine 392 du RBM2 pour une alanine n'a pas d'impact sur la liaison de Rnt1p à un substrat long de type NGNN. Par contre, cette mutation diminue l'affinité des substrats courts (19 pb) d'un facteur 6 (Chapitre 2 (Liang et al., 2014)). Ce résultat suggère que ce motif de liaison à l'ARN serait davantage impliqué dans la liaison d'ARN courts qui seraient liés de manière moins stable par Rnt1p autrement. Lors de la liaison d'ARN long ayant

1 une boucle optimale, il est possible que les autres interactions entre Rnt1p et l'ARN
 2 soient suffisamment stables pour compenser la perte d'interaction avec ce RBM
 3 (Figure 9).
 4



5
 6 **Figure 10 : Interactions entre Rnt1p et l'ARN**

7 A) Liste des interactions effectuées par Rnt1p sur l'ARN. Les régions fonctionnelles
 8 précédemment identifiées sont délimitées par des pointillés et la région médiane est indiquée.
 9 B) Modèle de l'arrangement du dimère de Rnt1p sur un substrat. Les RBM sont numérotés
 10 de 0 à 4, une des sous-unités du dimère est en bleu et l'autre en vert.

11

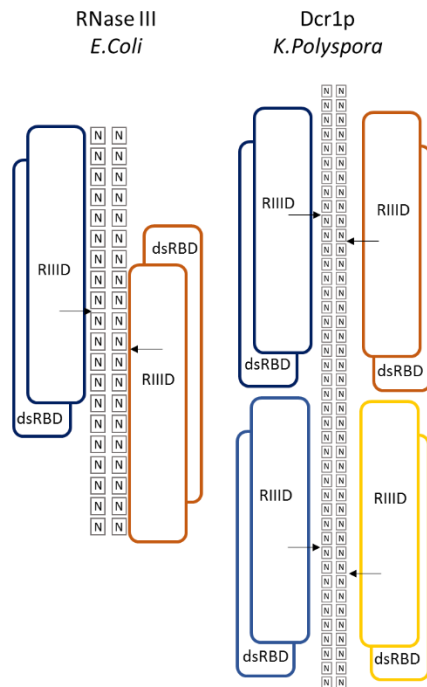
4. Une même famille, deux modes de reconnaissance des ARN

De manière très intéressante, la littérature en place possède maintenant plusieurs structures et modes d'action proposées pour les RNases III. Sans proposer une nouvelle nomenclature de classification des RNases III, on peut tout de même les séparer selon qu'elles reconnaissent de manière générale l'ARNdb ou qu'elles reconnaissent l'ARNdb par une extrémité ou une jonction (Figure 11). Le premier exemple correspond au mécanisme de base de la RNases III bactérienne dans lequel l'enzyme reconnaît la structure hélicale de l'ARNdb (Gan et al., 2006, 2008). Un mécanisme semblable a aussi été proposé pour Dicer chez les levures (Weinberg et al., 2011). Dans ce cas, la structure hélicale de l'ARNdb est reconnue et les enzymes s'assemblent par la suite côte à côte pour générer une série de clivage distant d'environ 23 nucléotides (Weinberg et al., 2011) (Figure 3). Antinomiquement, Rnt1p clive spécifiquement les tige-boucles d'ARN en s'ancrant sur la guanine et les paires de bases près de la boucle (Chapitre 2, (Liang et al., 2014)). Ce mode de reconnaissance donne deux particularités à cet enzyme. Premièrement, elle atténue la reconnaissance générale des ARNdb par Rnt1p. Ceci a pour effet que *S.cerevisiae* exerce une certaine tolérance à l'ARNdb présent dans les cellules, comme celui qui est originaire des virus à ARN. Plusieurs espèces de levures possèdent des enzymes de type Dicer et la fonction d'ARN interférent chez *S.cerevisiae* peut être facilement rétablie en exprimant simplement Dcr1p et Ago1p de *S.castellii*, une souche de *Saccharomyces* qui possède l'ARN interférent. *S.cerevisiae* est une des espèces de levures qui aurait perdu le mécanisme d'interférence à l'ARN afin de co-évoluer avec le « Yeast Killer virus » qui confère un avantage à la souche hôte par un système de toxine/antitoxine (Drinnenberg et al., 2011). Cette incompatibilité entre l'ARN interférent et les souches pour lesquelles le Yeast Killer Virus est endémique est aussi constatée chez d'autres espèces de levures (Drinnenberg et al., 2011). Une autre conséquence de la reconnaissance d'une extrémité de la tige-boucle d'ARN est que le clivage est effectué à une distance fixe du point d'ancrage. Cette particularité est

1 partagée chez d'autres RNases III comme lors de la maturation de pre-miARN par
2 Dicer (MacRae et al., 2006). La maturation des pre-miARN demande un clivage précis
3 pour obtenir le miARN mature. Le site de clivage est déterminé par l'extrémité de la
4 tige qui possède 2 nucléotides 3' saillants. Ceux-ci constituent le point d'ancrage qui
5 est reconnu par le domaine PAZ de Dicer. Le site de clivage est mesuré à partir de
6 ce point pour effectuer les deux clivages sur le pre-miARN (Figure 11). De manière
7 intéressante, Dicer chez *C.elegans* est exprimée sous deux formes : une forme
8 longue et une forme courte, générée par clivage protéolytique (Sawh and Duchaine,
9 2013). L'enzyme complète est impliquée dans la maturation des miARN. La forme
10 courte, pour laquelle la partie N-terminale contenant le domaine PAZ, hélicase et DUF
11 est absente, possède une activité accrue sur les longs ARNdb, rappelant le
12 mécanisme de Dcr1p chez *K.polyspora*. Lors de la génération des pré-miARN par
13 Drosha, celle-ci reconnaît aussi une extrémité de l'ARN s'ancrant à la jonction simple
14 brin double brin de l'ARN. (Kwon et al., 2016). Ce mécanisme est attribuable à une
15 extension dans le domaine RIID-A formant une hélice blocus (« bump helix ») qui se
16 lie à la base de la structure d'ARNdb et qui positionne le site de clivage à 11 paires
17 de bases de la jonction entre la tige et l'ARN simple brin. Les RNases III peuvent donc
18 à la fois reconnaître l'intérieur de la structure d'ARNdb, mais aussi exercer une
19 spécificité à partir d'une des extrémités de l'ARN.

20

A Reconnaissance interne



B Reconnaissance d'extrémité ou de jonction

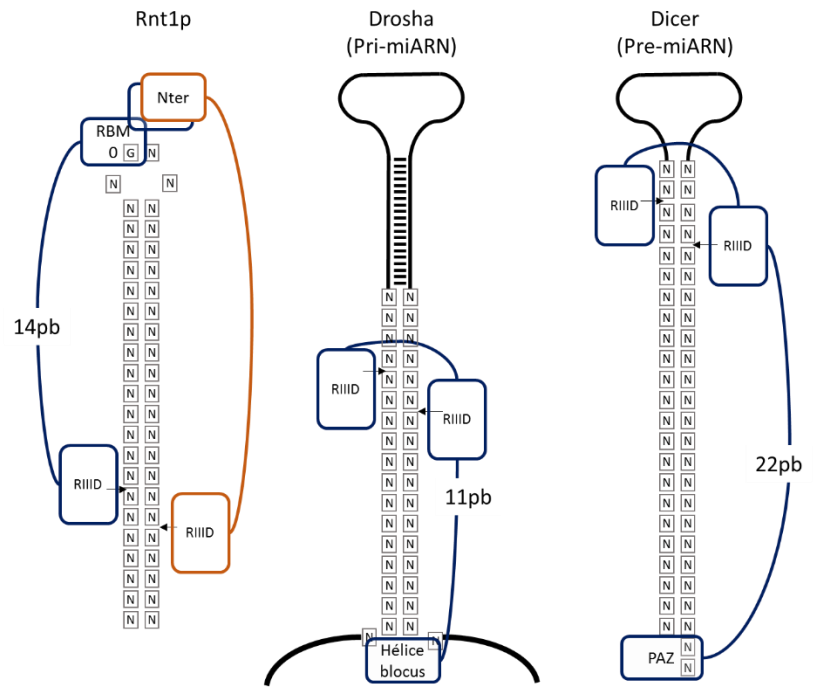


Figure 11 : Deux modes de reconnaissance des ARNdb par les RNases III.

A) La reconnaissance interne de la structure de l'ARN par les interactions rapprochées du dsRBD et domaine RNase III. Les sous-unités de chaque dimère sont représentées de différentes couleurs et les sites de clivages par des flèches. B) La reconnaissance d'une extrémité de l'ARN dicte un clivage à une distance de cette extrémité. Pour chaque enzyme les motifs responsables de la reconnaissance de l'extrémité sont identifiés et les sites de clivages indiqués par des flèches. Pour Rnt1p chaque sous-unité du dimère est représentée de couleurs différentes.

5. Le clivage par les RNases III est plus efficace que précédemment rapporté

La caractérisation en temps réel du clivage effectué par Rnt1p révèle que la phase initiale de réaction a une activité catalytique de 65 molécules par minute, ce qui est environ 12 fois plus rapide que ce qui a été précédemment rapporté pour des substrats semblables (Lavoie and Abou Elela, 2008), mais d'un niveau similaire à ce qui a été rapporté pour la RNase H (57 min^{-1}) (Fang et al., 2005b), une enzyme ayant un site catalytique semblable aux RNases III (Gan et al., 2006). Cette phase rapide a été étudiée de manière indirecte pour la RNase III de *E.coli* où l'extrapolation de la réaction démontrait qu'une phase préalable à l'état d'équilibre était présente et dépendante de la concentration d'enzyme (Campbell Jr et al., 2002). Notre étude démontre que la phase lente de la réaction est causée par l'accumulation de produits de réaction (Chapitre 3, (Comeau et al., 2016)). La dégradation ou l'ajout de produits permet en effet d'étendre la durée de la phase initiale ou de débiter la réaction en état pré-inhibée. Le point le plus surprenant est que ce ne sont pas tous les produits de réactions qui peuvent inhiber efficacement la réaction. En utilisant le signal de clivage de l'ARN de *U5* et de *MIG2* comme modèles, nous avons établi que les propriétés inhibitrices des produits de réactions sont prédéterminées dans la structure du produit de réaction qui possède la tétraboucle NGNN (Mig2-PR, U5-PR). De manière plus précise, les deux premières positions situées directement au-dessus du premier site de coupure doivent former des paires de bases afin que le produit inhibe efficacement la réaction. Ceci constitue le motif propre au produit inhibiteur (Figure 12).

6. Les ARN clivés par Rnt1p possédant le motif inhibiteur sont davantage présents dans les ARNm

Lors de leurs thèses à notre laboratoire, Jules Gagnon et Mathieu Lavoie se sont intéressés à l'identification des substrats de Rnt1p à l'échelle génomique en mettant au point deux méthodes : le Cut and Chip et le SALI (Sequencing Assisted Loop Identification) (Gagnon et al., 2015). Brièvement, la première méthode consiste à détecter avec une puce d'expression la dégradation de fragments d'ARN qui est induite par Rnt1p et la deuxième méthode consiste à séquencer des tiges-boucles d'ARN libérées suite à l'incubation d'ARN totaux d'une souche *rnt1Δ* avec Rnt1p. Ces deux méthodes ont permis d'identifier des centaines de gènes dégradés par Rnt1p et il est intéressant de vérifier quelle proportion des potentiels nouveaux substrats posséderait un motif inhibiteur. De manière générale, la structure consensuelle obtenue lors de cette étude démontre que la majorité des substrats ayant une tétraboucle de type NGNN ne possède pas le motif inhibiteur (Figure 12). En effet, les deux positions directement au-dessus du site de clivage ont un enrichissement significatif de résidus non-pairés à cette position, malgré que les positions suivantes forment majoritairement une structure double-brin. Ceci ne signifie pas qu'aucun ARN ne générerait de produits inhibiteurs, mais que ceux-ci sont minoritaires par rapport aux ARN ayant une région d'efficacité de clivage optimale. Le meilleur ensemble de donné pour évaluer la présence de motif inhibiteur présenté dans cet article est celui du SALI. Dans cette expérience, 106 tige-boucles d'ARN de type NGNN clivées par Rnt1p (29 ARNnc et 77 ARNm) ont été séquencées. L'avantage de cet ensemble de données est que le site de coupure est établi avec précision en séquençant directement le produit de réaction, contrairement aux sites de dégradation d'ARN prédits par Cut and Chip. Cette dernière méthode ne permet de voir que de manière large les fragments dont la dégradation est induite par Rnt1p et le site de clivage doit être prédit à l'aide de méthodes bio-informatiques. Cette prédiction est assez difficile, car plusieurs ARN possèdent des structures avec des mésappariements ou des

1 paires de bases non canoniques qui peuvent influencer sur la position des sites de
2 clivages. De plus, certains fragments dégradés contiennent plusieurs tiges-boucles
3 potentiellement reconnues par Rnt1p et il est difficile d'assigner la dégradation à une
4 tige-boucle précise alors que le séquençage de produits de réaction attribue une
5 séquence précise à l'ARN clivé. En utilisant la structure secondaire des produits de
6 réaction établis par SALI, cette banque a été soumise au critère d'identification des
7 produits inhibiteurs, soit d'avoir deux paires de bases canoniques directement au-
8 dessus du site de coupure. Sur les 77 ARNm identifiés par SALI, 12 (16%) possèdent
9 le motif inhibiteur alors que sur les 29 ARNnc, seulement un possède ce motif (3%)
10 (Figure 12). Cette observation suggère qu'au cours de l'évolution, la majorité des
11 ARNnc auraient évolués pour obtenir des clivages de maturation efficaces ne
12 générant pas de produits inhibiteurs alors que certains ARNm possèdent ce motif soit
13 pour obtenir un clivage partiel ou conditionnel, ou bien car le clivage par Rnt1p pour
14 ces ARN est étroitement lié à d'autres facteurs permettant une dissociation et une
15 dégradation des produits de réaction. Aucune fonction biologique précise n'est
16 enrichie dans l'ensemble d'ARNm ayant un produit avec le motif inhibiteur,
17 possiblement en raison de la petite taille de l'échantillon. Il est aussi envisageable que
18 ces gènes ne sont pas liés par une fonction biologique précise, mais par un mode de
19 régulation de leur expression génique et de leur changement d'expression dans une
20 de condition de culture précise.

21

1 concentration d'ARN utilisé (d'ordre 2) tandis que le second changement de
2 conformation est indépendant de la concentration d'ARN de départ (d'ordre 1). Dans
3 cette étude la deuxième étape a été identifiée comme étant limitante, étant donné
4 qu'elle était de 15 à 30 fois plus lente que la première dans les conditions étudiées.
5 Cette étape correspond à la catalyse et la relâche du produit de réaction. Comme il a
6 été démontré au chapitre 2 (Comeau et al., 2016), nos données indiquent que pour
7 Rnt1p, la dissociation est l'étape limitante du mécanisme de réaction. Cette étude a
8 aussi démontré que les changements de conformations effectués sont dépendants de
9 la présence d'ion divalent, ce qui suggère que ces deux étapes sont liées avec la
10 fonction du domaine catalytique. La liaison générale des ARN au domaine de liaison
11 à l'ARNdb est indépendante de la présence d'ion magnésium et plusieurs études ont
12 caractérisé la liaison des RNases III à leurs substrats en absence de catalyse
13 (Lamontagne and Elela, 2004; Lamontagne et al., 2000; Lavoie and Abou Elela,
14 2008). Le premier changement de conformation, d'ordre 2, est donc probablement
15 une étape où l'ARN est guidé vers, ou interagit avec le site catalytique en plus de
16 l'étape initiale de reconnaissance. De la même façon, lors de notre essai de liaison
17 des produits de réaction détectée par résonance plasmonique, les différences dans
18 l'interaction entre Rnt1p et les produits de réaction n'ont été constatées qu'en
19 présence de magnésium. La liaison en absence de magnésium, à la fois pour Mig2-
20 PR et U5-PR est facilement réversible dans les deux cas (données non publiées). En
21 présence de magnésium, la vitesse de dissociation de Mig2-PR est fortement réduite
22 et l'affinité est augmentée d'un facteur 10, ce qui suggère que dans une configuration
23 où l'enzyme est active catalytiquement, le relâchement du produit de réaction est
24 limitant. Notre caractérisation biochimique de la liaison des produits de réaction, mise
25 en contexte avec cette étude laisse croire que les RNases III subissent deux
26 changements de conformation : un pour charger l'ARN vers le site catalytique et un
27 deuxième pour dissocier le produit de réaction.

8. Le modèle par étapes du mécanisme de Rnt1p

Ce n'est que cette année qu'un modèle structural, publié par l'équipe de Xinhua Ji, a jeté la lumière sur les changements de conformation possibles entre les différents états de Rnt1p (Song et al., 2017). Cette équipe a résolu la structure générale de l'apoenzyme Rnt1p par SAX ainsi que le complexe préclivage par cristallographie et a publié un modèle en cinq étapes pour expliquer le cycle fonctionnel de Rnt1p. Ces étapes sont l'apoenzyme libre, la sélection des substrats, l'enzyme chargée, le complexe de préclivage et le complexe post-clivage (Figure 13). On n'observe que peu de changements structuraux majeurs entre la structure préclivage et le complexe post-clivage présenté précédemment dans cette thèse (chapitre 2, (Liang et al., 2014)). Les changements observés se retrouvent majoritairement au niveau du domaine nucléase ou le squelette phosphate de l'ARN est tiré vers le site actif de l'enzyme.

Au contraire, un changement majeur dans l'arrangement des domaines est remarqué entre la protéine libre et la protéine chargée. L'apoenzyme Rnt1p a une conformation « ouverte » dans laquelle un des domaines de liaison à l'ARNdb ainsi que le dimère des domaines N-terminal sont distant l'un de l'autre et loin du site actif. Au contraire, les structures cristallines des complexes préclivages et post-clivages démontrent que ces domaines interagissent ensembles et forment une structure beaucoup plus compacte avec le domaine nucléase (Chapitre 2, Liang et al., 2014) (Figure 13). Ceci nous indique que Rnt1p exécute un changement de conformation majeur suite à la liaison d'un ARN et un autre changement de conformation pour relâcher le produit de réaction et retourner à sa forme libre. Dans le cas des produits inhibiteurs, le changement de conformation qui mène au relâchement du produit est probablement limitant (Figure 14).

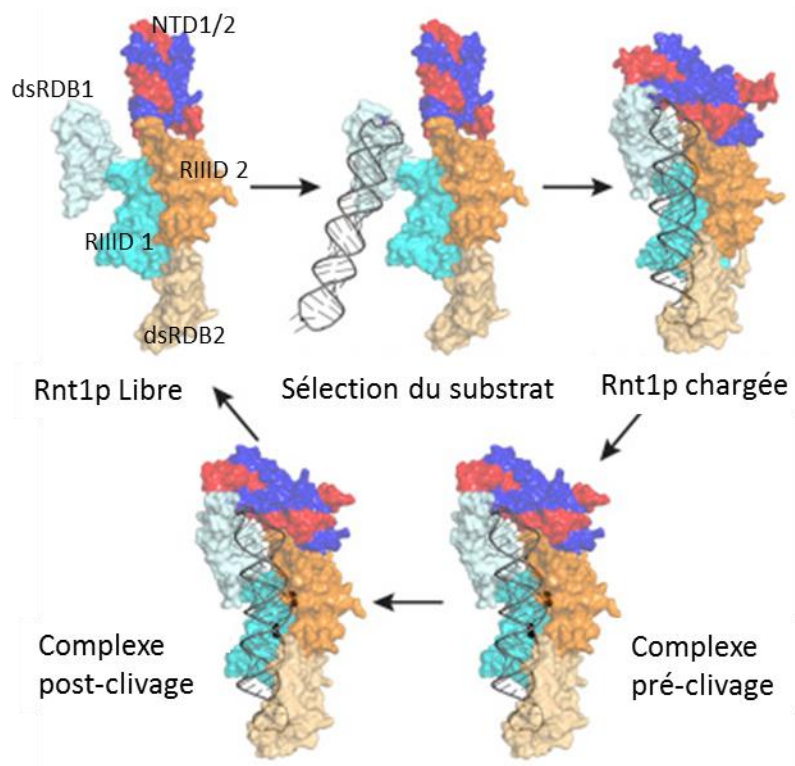


Figure 13, adaptée de (Song et al 2017) : Le cycle fonctionnel de Rnt1p. Cette figure présente le modèle structural par étape basé sur les structures déterminées pour Rnt1p libre, le complexe préclivage et le complexe post-clivage. Les domaines de liaison à l'ARNdb (dsRBD), catalytique (RIID) et N-terminal (NTD) sont identifiés sur la structure de l'apoenzyme.

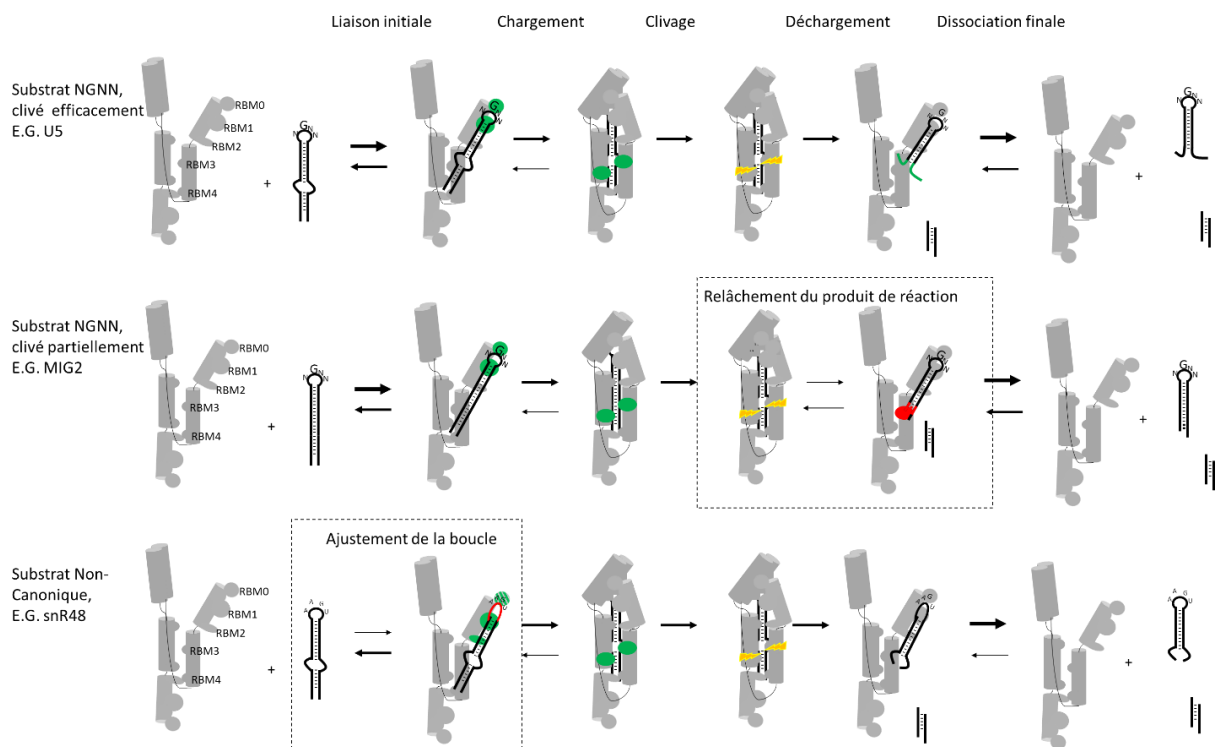
9. Le comportement inhibiteur du produit de l'ARN MIG2 et U5 nous renseigne sur le mécanisme de Rnt1p

Lorsque l'on examine le modèle par étape du mécanisme de Rnt1p, on remarque un changement de conformation important entre la structure de l'apoenzyme et le complexe chargé. Une des grandes interrogations qui reste en suspens est de savoir ce qui déclenche cette transition pour charger l'ARN dans le site catalytique. Si l'on examine le comportement inhibiteur et les caractéristiques de la liaison des produits

1 d'ARN, on peut émettre une hypothèse expliquant ce qui déclenche ce changement
2 de conformation. Si l'on prend le cas de U5-PR, lorsque l'on ajoute cet ARN, l'effet
3 calculé sur la réaction catalysée par Rnt1p n'est présent que pour le K_m . Ceci signifie
4 que cet ARN ne peut qu'effectuer une inhibition de type compétitive, impliquant que
5 sa liaison est facilement réversible. Comme démontré lors des essais de liaison du
6 produit de réaction avec Rnt1p, U5-PR se dissocie 5 fois plus rapidement et a une
7 affinité 10 fois inférieure à celle de Mig2-PR (222 nM vs 23 nM). En comparaison,
8 l'ajout de Mig2-PR affecte à la fois la valeur du K_m et du k_{cat} observée. Cette inhibition
9 mixte impliquerait que Mig2-PR peut se lier et être présent au site catalytique. Ceci
10 demande un changement de conformation pour charger et relâcher l'ARN causant la
11 dissociation lente de Mig2-PR. La différence majeure entre les deux produits de
12 réaction est que Mig2-PR possède une structure double-brin en fin d'hélice, suggérant
13 que si l'ARN possède une structure suffisamment longue pour effectuer des
14 interactions avec le domaine nucléase, cela déclenchera le chargement de l'ARN au
15 centre catalytique. Pour des ARN plus courts, l'interaction se limite à l'étape de liaison
16 initiale avec le domaine de liaison à l'ARNdb, qui n'implique pas de changement de
17 conformation et qui est facilement réversible. Les paires de bases directement au-
18 dessus du site de clivage, qui constitue le motif inhibiteur, auraient comme effet que
19 le produit de réaction est reconnu comme étant un substrat, et déclenchent les
20 changements de conformation qui ont pour but de charger l'ARN à être clivé vers le
21 domaine catalytique (Figure 13). Ces changements de conformations sont limitants et
22 confèrent à Mig2-PR son caractère inhibiteur. Cette observation nous renseigne aussi
23 sur le mécanisme par lequel de manière générale Rnt1p distingue les substrats des
24 produits. En amenant l'ARN vers le domaine nucléase seulement lorsque l'ARN
25 double-brin est suffisamment long pour interagir à la fois avec le domaine de liaison
26 à l'ARNdb et le domaine RIIID, l'enzyme distingue les substrats des produits de
27 réaction si ceux-ci n'ont pas le motif inhibiteur. Si l'on examine à nouveau la structure
28 consensus d'un substrat de Rnt1p avec une tétraboucle NGNN (Figure 11), on
29 remarque que les positions directement au-dessus du site de clivage sont

1 majoritairement non appariées alors que les positions de la région d'efficacité de
2 clivage suivant le premier site de coupure sont majoritairement appariées. Ceci
3 permet de reconnaître le substrat à l'aide de l'interaction concomitante du domaine
4 nucléase et du domaine de liaison à l'ARN. Une fois le clivage effectué, le produit
5 relâché est une tétraboucle NGNN possédant une structure d'ARNdb inférieure à 14
6 paires de bases. Cet ARN ne peut pas déclencher le changement de conformation
7 menant au chargement de l'ARN vers le centre catalytique, même s'il se réassocie
8 avec le domaine de liaison à l'ARNdb. Il n'est donc pas considéré par l'enzyme comme
9 étant un substrat.

10



11

12 **Figure 14 : Mécanisme d'action de Rnt1p**

13 Les domaines de Rnt1p sont représentés en cylindres gris et la conformation des domaines
14 est basée sur Song et al., 2017. Le cycle fonctionnel de Rnt1p est divisé en cinq étapes
15 indiquées en haut. Les interactions majeures impliquées dans chaque étape sont mises en
16 évidence de manière colorée.

17

1 Conclusion et perspectives

2

3 Les RNase III sont une classe d'enzyme présente dans tous les domaines du vivant
4 qui ont un rôle crucial à la fois dans la maturation et la dégradation des ARN. L'étude
5 de Rnt1p, la RNase III de *S.cerevisiae* nous a permis de découvrir que cette enzyme
6 sélectionnait les ARN qui possèdent une guanine en utilisant un motif de liaison
7 capable de reconnaître et de lire la séquence de celle-ci. Ce mode de liaison nous
8 renseigne sur un mécanisme qui permet au RNase de s'ancrer à un point sur l'ARN
9 pour dicter un clivage à un site distant de la liaison. Ce point d'ancrage n'est pas
10 nécessairement garant d'une bonne réactivité, car un code de réactivité est aussi
11 présent à l'intérieur de la structure d'ARNdb du substrat. Les paires de bases au-
12 dessus du site de clivage sont essentielles pour qu'un produit de réaction soit
13 considéré inhibiteur et permet à celui-ci de lier l'enzyme stablement et de réduire la
14 capacité de celle-ci à cliver d'avantages d'ARN. Malgré tous les avancements sur la
15 compréhension du rôle des RNases III à l'aide de Rnt1p comme modèle, plusieurs
16 questions restent en suspens et mériteraient d'avantage d'investigation.

17

18 Le motif inhibiteur et le mécanisme des RNases III

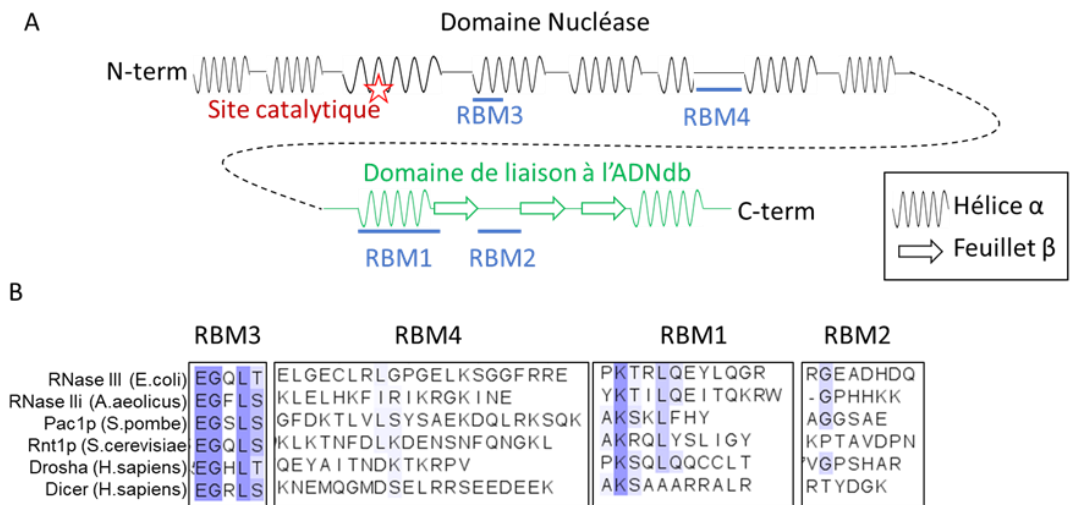
19

20 Tout d'abord, selon les substrats répertoriés par Jules Gagnon (Gagnon et al., 2015),
21 environ 15% des ARNm clivés par Rnt1p pourraient être inhibiteur. Comme mentionné
22 précédemment aucun lien ne les unit au niveau des fonctions biologiques. Cependant
23 une piste qui n'a pas été étudiée serait de savoir si ces ARN avaient un mode commun
24 de régulation de leur expression. *MIG2* est un gène assez particulier du fait qu'en
25 condition « normale » seulement une partie des ARNm est dégradée par Rnt1p et
26 c'est lors de l'arrêt de transcription que l'action de Rnt1p permet une répression rapide

1 de l'expression de *MIG2*. Aucune information n'est disponible afin de savoir si les
2 autres substrats ayant le motif inhibiteur suivraient le même mode d'action.

3 De plus, comme discuté précédemment, la relâche du produit semble être l'étape
4 limitante du mécanisme de réaction des RNase III. Ce phénomène a été observé à la
5 fois pour Rnt1p (Chapitre 3) et pour la RNase III de *E.coli* (Campbell Jr et al., 2002).
6 Il serait intéressant de vérifier la généralité et l'impact d'un tel phénomène. De manière
7 surprenante, de tous les motifs de liaison à l'ARN, le RBM3 est de loin le motif le plus
8 conservé (Figure 15). Dans la structure cristalline de Rnt1p, ce RBM interagit avec les
9 deux nucléotides directement au-dessus du site de clivage, il est donc probable qu'il
10 soit responsable de l'interaction causant l'inhibition. Cette étude permettrait à la fois
11 de vérifier la généralité du mécanisme de relâche lente du produit de réaction et
12 l'impact de la mutation du RBM3 sur le mécanisme des RNase III.

13



14

15 **Figure 15 : Conservation des motifs de liaison à l'ARN.**

16 A) Schéma de la structure commune aux RNase III comprenant le domaine nucléase et le domaine de
17 liaison à l'ARNdb. La position du site catalytique et des motifs de liaison à l'ARN (RBM) y sont indiqués.
18 B) Conservation des RBM. Les séquences des RBM d'enzyme de *E.coli*, *A.aeolicus*, *S.pombe*,
19 *S.cerevisiae* et *H.sapiens* y sont présentées. Le degré de conservation de chaque position est
20 représenté par des teintes de bleu.

21

1 **La reconnaissance d'autres substrats.**

2

3 La liaison initiale des substrats de Rnt1p est déterminée de manière indépendante du
4 clivage. Cette-ci dépend de la séquence de la boucle et de la stabilité des paires de
5 bases adjacentes à celle-ci alors que la décision de charger un ARN au site
6 catalytique dépend de la longueur de la tige d'ARN. En suivant ce modèle, il n'est pas
7 impossible que des protéines liant l'ARN puissent s'associer avec Rnt1p pour
8 permettre de lier des ARN avec une spécificité différente que celle présentée dans
9 cette thèse. Lors de l'étude transcriptomique ayant pour but d'identifier l'ensemble des
10 substrats de Rnt1p (Gagnon et al., 2015), une part des ARN identifiés ne possèdent
11 pas une boucle avec une guanine et le mécanisme par lequel Rnt1p sélectionne ses
12 substrats est encore ambigu. Il est possible que la liaison initiale soit facilitée par un
13 autre facteur, comme on retrouve chez l'humain avec l'interaction de Drosha avec
14 DGCR8 qui permet de stabiliser l'interaction avec les transcrits primaires de miARN.

15 Une autre hypothèse est que Rnt1p est capable de reconnaître d'autres ARN que les
16 tétraboucles G2 en utilisant d'autres moyens que le RBM0 pour la liaison initiale.
17 Comme mentionné précédemment, Rnt1p est capable de cliver efficacement les
18 tétraboucles de type AAGU à la fois in vivo et in vitro (Ghazal and Elela, 2006). La
19 structure cristalline de Rnt1p a révélé que cette enzyme effectue un pont hydrogène
20 avec la face watson-crick de l'adénine en position 1 de la tétraboucle (chapitre 2,
21 Figure S3A). En investiguant davantage, on peut remarquer que l'adénine de la
22 tétraboucle est dans une pochette de liaison qui implique une interaction avec sa face
23 watson-crick, un empilement avec le cycle de la purine et une interaction avec le sucre
24 de cette base (Figure 16). Cette interaction implique à la fois le domaine de liaison à
25 l'ARNdb et le domaine N-terminal. Bien que ces interactions ne soient pas aussi
26 nombreuses que ceux rapportés pour la guanine des tétraboucles G2, il est possible
27 qu'elles soient requises pour que l'enzyme lie efficacement d'autres classes d'ARN
28 telles que les tétraboucles AAGU.

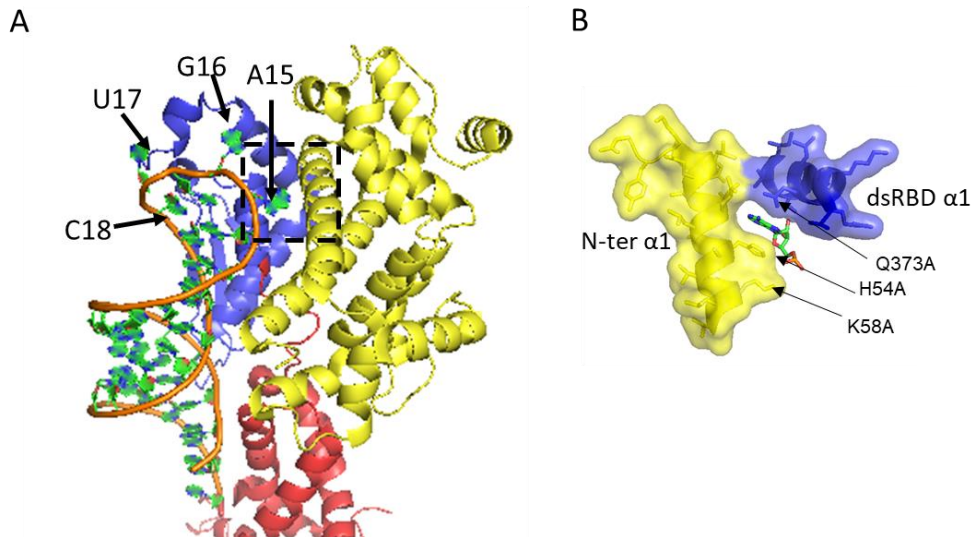


Figure 16 : Motif putatif de liaison de l'adénine

A) Structure de Rnt1p lié à l'ARNb. La structure celle présentée au chapitre 2 (PDB 4OOG). Le domaine N-terminal est en jaune, le domaine de liaison à l'ARNdb en bleu et le domaine nucléase en rouge. Les bases formant la tétraboucle AGUC sont indiquées. B) Interaction de Rnt1p avec l'adénine de la tétraboucle. La structure correspond à la section encadrée en A. Les trois acides aminés entrant en contact avec l'adénine sont indiqués.

Les modifications post-traductionnelles.

Enfin, en 2013 un article a présenté l'étude à large échelle de l'ubiquitination et de la phosphorylation chez *S.cerevisiae* en utilisant la spectrométrie de masse (Swaney et al., 2013). Bien que ce ne soit pas le sujet principal de cet article, un peptide ayant des marques de phosphorylation pour Rnt1p a été identifié. La sérine 453 est un résidu phosphorylé dans cette étude. Cette position n'est pas anodine, car cette sérine est située directement dans le motif de liaison de la guanine et elle interagit normalement avec la face Watson-Crick de la guanine de la boucle à l'aide de sa chaîne latérale. L'impact d'une telle modification sur la liaison et la spécificité des substrats est inconnu et les kinases impliquées restent aussi à être identifiées. Nous

1 n'avons donc aucune information sur le rôle, l'impact où la condition qui déclenche
2 une telle modification malgré que cette phosphorylation pourrait modifier
3 drastiquement la spécificité de Rnt1p.
4

ANNEXE 1

Tableau 2 : Effet des mutations de Rnt1p sur la liaison des tétraboucles de type AAGU.

ARN long type AAGU	
Protéine	Kd (μ M)
Rnt1p	4.9 \pm 1.3
S453K	13.4 \pm 2.9
R450A	17.9 \pm 4.1
P449A	19.2 \pm 4.5
K392A	6.8 \pm 1.6
Q373A	4.7 \pm 1.2
Δ NTD	4.4 \pm 1.0

BIBLIOGRAPHIE

- Agranat-Tamir, L., Shomron, N., Sperling, J., and Sperling, R. (2014). Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Res.* 42, 4640–4651.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* 17, 1497–1506.
- Babiskin, A.H., and Smolke, C.D. (2011a). A synthetic library of RNA control modules for predictable tuning of gene expression in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 7, 471.
- Babiskin, A.H., and Smolke, C.D. (2011b). Synthetic RNA modules for fine-tuning gene expression levels in yeast by modulating RNase III activity. *Nucleic Acids Res.* 1–14.
- Baker, K.E., and Parker, R. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: Terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 293–299.
- Ballarino, M., Morlando, M., Pagano, F., Fatica, A., and Bozzoni, I. (2005). The Cotranscriptional Assembly of snoRNPs Controls the Biosynthesis of H / ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* The Cotranscriptional Assembly of snoRNPs Controls the Biosynthesis of H / ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* †. *Mol. Cell. Biol.* 25(13), 5396–5403.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 11, 241–247.
- Beelman, C. a, Stevens, a, Caponigro, G., LaGrandeur, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M., and Parker, R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* 382, 642–646.
- Beran, R.K., and Simons, R.W. (2001). Cold-temperature induction of *Escherichia*

- 1 coli polynucleotide phosphorylase occurs by reversal of its autoregulation. *Mol.*
2 *Microbiol.* 39, 112–125.
- 3 Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5'
4 terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3171–3175.
- 5 Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a
6 bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. 143, 363–366.
- 7 Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2008).
8 Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*
9 452, 846–850.
- 10 Billy, E., Wegierski, T., Nasr, F., and Filipowicz, W. (2000). Rcl1p, the yeast protein
11 similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is
12 required for 18S rRNA biogenesis. *EMBO J.* 19, 2115–2126.
- 13 Birse, C.E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B. a, Keller, W., and Proudfoot, N.J. (1998).
14 Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast.
15 *Science* 280, 298–301.
- 16 Black, D.L., Chabot, B., and Steitz, J.A. (1985). U2 as well as U1 small nuclear
17 ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. *Cell* 42, 737–750.
- 18 Blaszczyk, J., Gan, J., Tropea, J.E., Court, D.L., Waugh, D.S., and Ji, X. (2004).
19 Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure* 12,
20 457–466.
- 21 Briggs, M.W., Burkard, K.T.D., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p , the Yeast Homologue
22 of the Human PM-Scl 100-kDa Autoantigen , Is Essential Rrp6p , the Yeast
23 Homologue of the Human PM-Scl 100-kDa Autoantigen , Is Essential for Efficient 5 .
24 8 S rRNA 3. 273, 13255–13263.
- 25 Cai, T., Aulds, J., Gill, T., Cerio, M., and Schmitt, M.E. (2002). The *Saccharomyces*
26 *cerevisiae* RNase mitochondrial RNA processing is critical for cell cycle progression

1 at the end of mitosis. *Genetics* **161**, 1029–1042.

2 Campbell Jr, F.E., Cassano, A.G., Anderson, V.E., and Harris, M.E. (2002). Pre-
3 steady-state and Stopped-flow Fluorescence Analysis of *Escherichia coli*
4 Ribonuclease III : Insights into Mechanism and Conformational Changes Associated
5 With Binding and Catalysis. *Analysis*.

6 Catala, M., Aksouh, L., and Elela, S.A. (2012). RNA-dependent regulation of the cell
7 wall Stress response. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7507–7517.

8 Chabot, B., Black, D.L., LeMaster, D.M., and Steitz, J. a (1985). The 3' splice site of
9 pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science*
10 **230**, 1344–1349.

11 Chanfreau, G., Elela, S. a., Ares, M., and Guthrie, C. (1997). Alternative 3'-end
12 processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.* **11**, 2741–2751.

13 Chanfreau, G., Legrain, P., and Jacquier, a (1998). Yeast RNase III as a key
14 processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.* **284**, 975–988.

15 Chu, S., Archer, R.H., Zengel, J.M., and Lindahl, L. (1994). The RNA of RNase MRP
16 is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
17 **91**, 659–663.

18 Comeau, M.A., Lafontaine, D.A., and Abou Elela, S. (2016). The catalytic efficiency
19 of yeast ribonuclease III depends on substrate specific product release rate. *Nucleic*
20 *Acids Res.* **44**, 7911–7921.

21 Crick, F.H.C. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**, 561–563.

22 Danin-Kreiselman, M., Lee, C.Y., and Chanfreau, G. (2003). RNase III-mediated
23 degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol. Cell* **11**, 1279–1289.

24 Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable
25 mRNAs in yeast: Evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* **7**,
26 1632–1643.

- 1 Dragon, F., Gallagher, J.E.G., Compagnone-Post, P. a, Mitchell, B.M., Porwancher,
2 K. a, Wehner, K. a, Wormsley, S., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., et al.
3 (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA
4 biogenesis. *Nature* 417, 967–970.
- 5 Drinnenberg, I. a, Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R.,
6 and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326, 544–550.
- 7 Drinnenberg, I. a, Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2011). Compatibility with killer
8 explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science* 333, 1592.
- 9 Duina, A.A., Miller, M.E., and Keeney, J.B. (2014). Budding yeast for budding
10 geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* 197,
11 33–48.
- 12 Elela, S.A., and Ares, M. (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3'
13 end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *EMBO J.* 17,
14 3738–3746.
- 15 Elela, S.A., Igel, H., and Ares, M. (1996). RNase III cleaves eukaryotic preribosomal
16 RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115–124.
- 17 Faber, A.W., Van Dijk, M., Raué, H. a, and Vos, J.C. (2002). Ngl2p is a Ccr4p-like
18 RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in
19 *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 8, 1095–1101.
- 20 Fang, F., Phillips, S., and Butler, J.S. (2005a). Rat1p and Rai1p function with the
21 nuclear exosome in the processing and degradation of rRNA precursors. *RNA* 11,
22 1571–1578.
- 23 Fang, S., Lee, H., Wark, a W., Kim, H.M., and Corn, R. (2005b). Determination of
24 ribonuclease H surface enzyme kinetics by surface plasmon resonance imaging and
25 surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Anal. Chem.* 77, 6528–6534.
- 26 Fernández-Pevida, A., Kressler, D., and de la Cruz, J. (2015). Processing of

1 preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6,
2 191–209.

3 Finnegan, E.F., and Pasquinelli, A.E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the
4 regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 51–68.

5 Gagnon, J., Lavoie, M., Catala, M., Malenfant, F., and Elela, S.A. bou (2015).
6 Transcriptome wide annotation of eukaryotic RNase III reactivity and degradation
7 signals. *PLoS Genet.* 11, e1005000.

8 Galy, V., Gadai, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., and Nehrbass,
9 U. (2004). Nuclear Retention of Unspliced mRNAs in Yeast Is Mediated by
10 Perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63–73.

11 Gan, J., Tropea, J.E., Austin, B.P., Court, D.L., Waugh, D.S., and Ji, X. (2006).
12 Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by
13 ribonuclease III. *Cell* 124, 355–366.

14 Gan, J., Shaw, G., Tropea, J.E., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2008). A
15 stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Mol.*
16 *Microbiol.* 67, 143–154.

17 Gaudin, C., Ghazal, G., Yoshizawa, S., Elela, S.A., and Fourmy, D. (2006). Structure
18 of an AAGU tetraloop and its contribution to substrate selection by yeast RNase III.
19 *J. Mol. Biol.* 363, 322–331.

20 Ge, D., Lamontagne, B., and Elela, S.A. (2005). RNase III-Mediated Silencing of a
21 Glucose-Dependent Repressor in Yeast. *Current* 15, 140–145.

22 Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raué, H. a (2000). The final step in the formation of
23 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA*
24 6, 1698–1703.

25 Ghazal, G., and Elela, S.A. (2006). Characterization of the reactivity determinants of
26 a novel hairpin substrate of yeast RNase III. *J. Mol. Biol.* 363, 332–344.

- 1 Ghazal, G., Ge, D., Gervais-Bird, J., Gagnon, J., and Abou Elela, S. (2005).
2 Genome-wide prediction and analysis of yeast RNase III-dependent snoRNA
3 processing signals. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2981–2994.
- 4 Ghazal, G., Gagnon, J., Jacques, P.-E., Landry, J.-R., Robert, F., and Elela, S.A.
5 (2009). Yeast RNase III triggers polyadenylation-independent transcription
6 termination. *Mol. Cell* 36, 99–109.
- 7 Ghosh, A., and Lima, C.D. (2010). *Enzymology of RNA cap synthesis*. Wiley
8 *Interdiscip. Rev. RNA* 1, 152–172.
- 9 Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., Mark, E., and Schmitt, M.E. (2004). RNase
10 MRP Cleaves the CLB2 mRNA To Promote Cell Cycle Progression : Novel Method
11 of mRNA Degradation RNase MRP Cleaves the CLB2 mRNA To Promote Cell Cycle
12 Progression : Novel Method of mRNA Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 945–953.
- 13 Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human
14 RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*
15 123, 631–640.
- 16 Hahn, S., and Young, E.T. (2011). Transcriptional regulation in *saccharomyces*
17 *cerevisiae*: Transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and
18 roles of activators and coactivators. *Genetics* 189, 705–736.
- 19 Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., and Gleizes,
20 P.E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. Wiley
21 *Interdiscip. Rev. RNA* 6, 225–242.
- 22 Hirose, T., and Steitz, J.A. (2001). Position within the host intron is critical for
23 efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
24 98, 12914–12919.
- 25 van Hoof, a, Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). Three conserved members of the
26 RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S,

- 1 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* 19, 1357–1365.
- 2 van Hoof, a, Staples, R.R., Baker, R.E., and Parker, R. (2000b). Function of the
3 ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 20,
4 8230–8243.
- 5 Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E. (2001). Evidence for a Pioneer Round
6 of mRNA Translation. *Cell* 106, 607–617.
- 7 Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and
8 Mattaj, I.W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA
9 splicing. *Cell* 78, 657–668.
- 10 Johnston, D.S.T., Brown, N.H., Gallt, J.G., and Jantscht, M. (1992). A conserved
11 double-stranded RNA-binding domain. 89, 10979–10983.
- 12 Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A., and Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar
13 ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 60,
14 897–908.
- 15 Kim, K.S., Manasherob, R., and Cohen, S.N. (2008). YmdB: A stress-responsive
16 ribonuclease-binding regulator of *E. coli* RNase III activity. *Genes Dev.* 22, 3497–
17 3508.
- 18 Kwon, S.C., Nguyen, T.A., Choi, Y.G., Jo, M.H., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.S.
19 (2016). Structure of Human DROSHA. *Cell* 164, 81–90.
- 20 LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A.,
21 and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a
22 nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713–724.
- 23 Lamanna, A.C., and Karbstein, K. (2009). Nob1 binds the single-stranded cleavage
24 site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
25 106, 14259–14264.
- 26 Lamontagne, B., and Elela, S.A. (2004). Evaluation of the RNA determinants for

1 bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J. Biol. Chem.* 279, 2231–2241.

2 Lamontagne, B., Tremblay, a, and Abou Elela, S. (2000). The N-terminal domain
3 that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal
4 required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1104–1115.

5 Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., and Elela, S. a (2001). The RNase III
6 family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA
7 metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 71–78.

8 Lamontagne, B., Hannoush, R.N., Damha, M.J., and Abou Elela, S. (2004).
9 Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic RNase III:
10 discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast Rnt1p. *J. Mol. Biol.*
11 338, 401–418.

12 Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon,
13 K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis
14 of the human genome. *Nature* 409, 860–921.

15 Lavoie, M., and Abou Elela, S.S. (2008). Yeast ribonuclease III uses a network of
16 multiple hydrogen bonds for RNA binding and cleavage. *Biochemistry* 47, 8514–
17 8526.

18 Lavoie, M., Ge, D., and Abou Elela, S. (2011). Regulation of conditional gene
19 expression by coupled transcription repression and RNA degradation. *Nucleic Acids*
20 *Res.* 1–13.

21 Lebars, I., Lamontagne, B., Yoshizawa, S., Aboul-Elela, S., and Fourmy, D. (2001).
22 Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into Rnt1p RNA
23 processing. *EMBO J.* 20, 7250–7258.

24 Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic
25 gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75,
26 843–854.

- 1 Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Kim, S., and
2 Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *425*,
3 1–5.
- 4 Liang, D., Zhou, H., Zhang, P., Chen, Y.Q., Chen, X., Chen, C.L., and Qu, L.H.
5 (2002). A novel gene organization: intronic snoRNA gene clusters from *Oryza sativa*.
6 *Nucleic Acids Res* 30, 3262–3272.
- 7 Liang, Y.H., Lavoie, M., Comeau, M.A., Elela, S.A., and Ji, X. (2014). Structure of a
8 Eukaryotic RNase III Postcleavage Complex Reveals a Double-Ruler Mechanism for
9 Substrate Selection. *Mol. Cell* 54, 431–444.
- 10 Lim L, C.E. (1970). Adenine-rich polymer associated with rabbit reticulocyte
11 messenger RNA. *Nature* 227, 710–2.
- 12 Liu, J., and Maxwell, E.S. (1990). Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the
13 mouse cognate hsc70 heat shock gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 6565–6571.
- 14 Lodish, H., Berk, A., and Matsudaira, P. (2004). *Molecular Cell Biology* (W. H.
15 freeman and Company).
- 16 López-maury, L., Marguerat, S., and Bähler, J. (2008). Tuning gene expression to
17 changing to evolutionary adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 583–593.
- 18 Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O., and Johnston, M.
19 (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate
20 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 1377–1391.
- 21 MacRae, I.J., Li, F., Zhou, K., Cande, W.Z., and Doudna, J.A. (2006). Structure of
22 Dicer and Mechanistic Implications for RNAi. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*
23 71, 73–80.
- 24 Maniatis, T., and Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome
25 expansion in metazoans. *Nature* 418, 236–243.
- 26 Manley, J.L. (1995). A complex protein assembly catalyzes polyadenylation of

1 mRNA precursors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 222–228.

2 Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.J. (2005). Understanding alternative splicing:
3 towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 386–398.

4 Mitchell, P., and Tollervey, D. (1996). Generated By an Exonuclease Processing
5 Mechanism. *Genes Dev.* 502–513.

6 Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J.
7 (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct.*
8 *Mol. Biol.* 15, 902–909.

9 Mount, S.M., Pettersson, I., Hinterberger, M., Karmas, A., and Steitz, J.A. (1983).
10 The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in
11 vitro. *Cell* 33, 509–518.

12 Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable
13 mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5' to 3'
14 degradation of the transcript. 855–866.

15 Nagel, R., and Ares, M. (2000). Substrate recognition by a eukaryotic RNase III: the
16 double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p selectively binds RNA containing a
17 5'-AGNN-3' tetraloop. *RNA* 6, 1142–1156.

18 Nahkuri, S., Taft, R.J., Korbie, D.J., and Mattick, J.S. (2008). Molecular Evolution of
19 the HBII-52 snoRNA Cluster. *J. Mol. Biol.* 381, 810–815.

20 Nicholson, A.W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA
21 cleavage. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 31–48.

22 Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by
23 alternative splicing. *Nature* 463, 457–463.

24 Nissen, P. (2000). The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond
25 Synthesis. *Science* (80-.). 289, 920–930.

- 1 O'Connor, C. M. & Adams, J.U.. (2010). Essentials of Cell Biology. In Essentials of
2 Cell Biology, (Cambridge, MA: NPG Education, 2010.), p.
- 3 Obernosterer, G., Leuschner, P.J.F., Alenius, M., and Martinez, J. (2006). Post-
4 transcriptional regulation of microRNA expression. 1161–1167.
- 5 Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J.F., Wellinger, R.J.,
6 Chabot, B., and Elela, S.A. (2011). Introns within ribosomal protein genes regulate
7 the production and function of yeast ribosomes. *Cell* 147, 320–331.
- 8 Parker, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191,
9 671–702.
- 10 Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA
11 turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 121–127.
- 12 Pérez-Ortín, J.E., Alepuz, P.M., and Moreno, J. (2007). Genomics and gene
13 transcription kinetics in yeast. *Trends Genet.* 23, 250–257.
- 14 Perron, M.P., and Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human
15 microRNA biogenesis and function. *Front Biosci* 13, 2537–2547.
- 16 Pertzev, A. V, and Nicholson, A.W. (2006). Characterization of RNA sequence
17 determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of
18 *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* 34, 3708–3721.
- 19 Proudfoot, N.J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher
20 eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 14, 105–110.
- 21 Proudfoot, N.J. (2011). Ending the message : poly (A) signals then and now. *Genes*
22 *Dev.* 25, 1770–1782.
- 23 Qu, L.H., Henras, A., Lu, Y.J., Zhou, H., Zhou, W.X., Zhu, Y.Q., Zhao, J., Henry, Y.,
24 Caizergues-Ferrer, M., and Bachellerie, J.P. (1999). Seven novel methylation guide
25 small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by
26 Rat1p and RNase III in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1144–1158.

- 1 Qu, L.H., Meng, Q., Zhou, H., and Chen, Y.Q. (2001). Identification of 10 novel
2 snoRNA gene clusters from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 29, 1623–
3 1630.
- 4 Régnier, P., and Portier, C. (1986). Initiation, attenuation and RNase III processing
5 of transcripts from the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal protein S15 and
6 polynucleotide phosphorylase. *J. Mol. Biol.* 187, 23–32.
- 7 Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, a E., Bettinger, J.C., Rougvie, a
8 E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates
9 developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- 10 Robertson, H.D., Webster, E., and Zinder, D. (1968). Purification and Properties
11 from *Escherichia coli* of Ribonuclease. *Methods* 243.
- 12 Romero-santacreu, L., Moreno, J., Perez-Ortin, J.E., and Alepuz, P. (2009). Specific
13 and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces*
14 *cerevisiae*. *Rna* 1110–1120.
- 15 Rosenfeld, M.G., Lin, C.R., Amara, S.G., Stolarsky, L., Roos, B.A., Ong, E.S., and
16 Evans, R.M. (1982). Calcitonin mRNA polymorphism: peptide switching associated
17 with alternative RNA splicing events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1717–1721.
- 18 Ryter, J.M., and Schultz, S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA –
19 protein interactions : structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA.
20 17, 7505–7513.
- 21 Sachs, A.B., and Davis, R.W. (1989). The poly(A) binding protein is required for
22 poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell*
23 58, 857–867.
- 24 Sawh, A., and Duchaine, T. (2013). A truncated form of dicer tilts the balance of
25 RNA interference pathways. *Cell Rep.* 4, 454–463.
- 26 Seipelt, R.L., Zheng, B., Asuru, a, and Rymond, B.C. (1999). U1 snRNA is cleaved

1 by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids*
2 *Res.* 27, 587–595.

3 Sollner-Webb, B. (1993). Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 75, 403–
4 405.

5 Song, H., Fang, X., Jin, L., Shaw, G.X., Wang, Y.-X., and Ji, X. (2017). The
6 Functional Cycle of Rnt1p: Five Consecutive Steps of Double-Stranded RNA
7 Processing by a Eukaryotic RNase III. *Structure* 25, 353–363.

8 Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro,
9 S., Rondón, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., et al. (2002). TREX is a
10 conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417,
11 304–308.

12 Sun, W., Jun, E., and Nicholson, a W. (2001). Intrinsic double-stranded-RNA
13 processing activity of Escherichia coli ribonuclease III lacking the dsRNA-binding
14 domain. *Biochemistry* 40, 14976–14984.

15 Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and
16 Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in
17 protein degradation. *Nat. Methods* 10, 676–682.

18 Thompson, D.M., and Parker, R. (2007). Cytoplasmic decay of intergenic transcripts
19 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 92–101.

20 Toesca, I., Nery, C.R., Fernandez, C.F., Sayani, S., and Chanfreau, G.F. (2011).
21 Cryptic transcription mediates repression of subtelomeric metal homeostasis genes.
22 *PLoS Genet.* 7.

23 Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith,
24 H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001). The sequence of the human
25 genome. *Sci. (Washingt. D C)* 291, 1304–1351.

26 Wang, Z., Hartman, E., Roy, K., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2011). Structure of a

1 yeast RNase III dsRBD complex with a noncanonical RNA substrate provides new
2 insights into binding specificity of dsRBDs. *Structure* 19, 999–1010.

3 Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends*
4 *Biochem. Sci.* 24, 437–440.

5 Weinberg, D.E., Nakanishi, K., Patel, D.J., and Bartel, D.P. (2011). The inside-out
6 mechanism of dicers from budding yeasts. *Cell* 146, 262–276.

7 Wu, J.A., and Manley, J.L. (1991). Base pairing between U2 and U6 snRNAs is
8 necessary for splicing of a mammalian pre-mRNA. *Nature* 352, 818–821.

9 Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2004). Structural basis for
10 recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding
11 domain of Rnt1p RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8307–8312.

12 Yamanaka, K., and Inouye, M. (2001). Selective mRNA Degradation by
13 Polynucleotide Phosphorylase in Cold Shock Adaptation in *Escherichia coli*
14 Selective mRNA Degradation by Polynucleotide Phosphorylase in Cold Shock
15 Adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2808–2816.

16 Zangrossi, S., Briani, F., Ghisotti, D., Regonesi, M.E., Tortora, P., and Dehò, G.
17 (2000). Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide
18 phosphorylase during cold acclimation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 36, 1470–
19 1480.

20

21

